Charakterisierung einer mutierten Lactose-Permease von ESCHERICHIA-COLI, die einen Defekt in der Translokation von gebundenem Substrat aufweist

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
ULRICH WEIGEL
aus Duisburg

1984

LEIDEN

Charakterisierung einer mutierten Lactose-Permease von ESCHERICHIA-COLI, die einen Defekt in der Translokation von gebundenem Substrat aufweist

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
ULRICH WEIGEL
aus Duisburg

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	5.4.1984
Dekan:	Prof. Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. P. Overath
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. V. Braun

"Die Suche nach Wahrheit ist in einer Hinsicht schwierig, in einer anderen leicht. Denn es ist erwiesen, daß niemand sie völlig meistern noch ganz verfehlen kann. Aber jeder fügt ein wenig zu unserem Wissen über die Natur hinzu, und aus all den zusammengetragenen Tatsachen geht eine gewisse erhabene Größe hervor".

Aristoteles

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	18
2.1.	Material	18
2.1.1.	Escherichia coli Stämme	18
2.1.2.	Plasmide	22
2.1.3.	Chemikalien	23
2.1.4.	Nährlösungen und Platten	25
2.1.5.	Puffer und Lösungen	27
2.2.	Methoden	30
2.2.1.	Mikrobiologische Methoden	30
2.2.1.1.	Aufbewahrung von Bakterien (28)	30
2.2.1.2.	Anzucht von Bakterienkulturen	30
2.2.1.3.	Bestimmung des Zellwachstums	31
2.2.1.4.	Induktion des lac-Operons	31
2.2.1.5.	F'-Kreuzung (28)	31
2.2.1.6.	Bildung von Homogenoten	32
2.2.1.7.	Rekombinationstest zur Kartierung von Mutationen (28)	32
2.2.1.8.	Transformation von Bakterien (modifiziert nach (9))	33
2.2.1.9.	Transfektion von JM 103 mit rekombinanter Phagen-DNA	33
2.2.1.10.	Vermehrung rekombinanter M13-Phagen	34
2.2.2.	Biochemische Methoden	35
2.2.2.1.	Proteinbestimmung	35
2.2.2.2.	Präparation von Zellsuspensionen	35
2.2.2.3.	Präparation von Zellmembranen	36
2.2.2.4.	Präparation von cytoplasmatischen Membranvesikeln	36
2.2.2.5.	EDTA-Behandlung von Zellen	36
2.2.2.6.	Bestimmung der ß-Galactosidase-Aktivität (35) (58)	37

Seite

2.2.2.7.	*in vivo*-NpßGal-Hydrolyse (35)	38
2.2.2.8.	Bestimmung der Anzahl an Permeasemolekülen durch Flußdialyse	39
2.2.2.9.	Aktiver Transport in Zellen	40
2.2.2.10.	Efflux-Bestimmung	40
2.2.2.11.	Isolierung von Plasmid-DNA über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation (13)	41
2.2.2.12.	Schnellpräparation von Plasmid-DNA	42
2.2.2.13.	DNA-Mengenbestimmung	43
2.2.2.14.	DNA-Präzipitation	43
2.2.2.15.	Phenol-Extraktion	43
2.2.2.16.	Spalten von DNA mit Restriktionsenzymen	44
2.2.2.17.	Ligierung von DNA	45
2.2.2.18.	Agarose-Gelektrophorese	45
2.2.2.19.	DNA-Längenstandard	46
2.2.2.20.	Ethidiumbromid-Färbung	46
2.2.2.21.	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	47
2.2.2.22.	DEAE-Cellulose-Säule	47
2.2.2.23.	Isolierung von rekombinanter M13-Phagen-DNA für die DNA-Sequenzierung nach Sanger (Template-Isolierung) (modifiziert nach (51))	48
2.2.2.24.	Hybridisierung von Primer- und Template-DNA (Annealing)	48
2.2.2.25.	DNA-Sequenzierung nach Sanger (50)	49
2.2.2.26.	DNA-Sequenzgele	49
2.2.2.27.	Autoradiographie	50
3.	Ergebnisse	51
3.1.	Isolation der Mutante *lacY*^{59}	51
3.2.	Kinetische Charakterisierung der Y^{59}-Mutante	54
3.2.1.	Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D für Lactose, GalSGal und Np«Gal	54
3.2.2.	Bestimmung der Zahl der Bindungsstellen in Y^{+}- und Y^{59}-Stämmen	56

		Seite
3.2.3.	NpßGal-Transport in Zellen	57
3.2.4.	Aktiver Transport von GalSGal	58
3.2.5.	Bestimmung von V_{max}, K_T und k_{cat} mit GalSGal als Substrat	62
3.2.6.	Aktiver Transport von Lactose	68
3.2.7.	Aktiver Transport von Np«Gal	74
3.2.8.	Efflux von GalSGal, Lactose und Np«Gal	77
3.3.	Genetische Charakterisierung der Y^{59}-Mutante	84
3.3.1.	Kartierung der Y^{59}-Mutation	84
3.3.1.1.	Kartierung durch in vitro Rekombination mit Restriktionsfragmenten	88
3.3.2.	DNA-Sequenz der Y^{59}-Mutation	93
3.3.3.	Bestimmung der Reversionsfrequenz der Y^{59}-Mutante	96
3.3.3.1.	Transport von Lactose durch die Revertante T35UW	98
3.3.4.	Isolierung einer Reversion vom Stamm T23UW	102
3.3.5.	DNA-Sequenz des 5'-Endes des Y^{59R}-Gens	103
3.3.6.	Charakterisierung der Revertante T36UW	105
3.4.	Versuche zum Nachweis eines negativen dominanten Effekts der Y^{59}- und der $Y^{-d}3$-Mutation auf das Y^{+}-Gen	105
3.4.1.	Versuche zum Nachweis eines negativen Dominanzeffekts der Y^{59}-Mutation	106
3.4.2.	Versuche zum Nachweis eines negativen Dominanzeffekts der $Y^{-d}3$-Mutation	109
3.4.2.1.	Phänotypische Charakterisierung der Stämme HB3 und 71-56-10 $pY^{-d}3$	109
3.4.2.2.	Bindung und Transport in den Stämmen HB3 und 71-56-10$pY^{-d}3$	110
3.5.	Versuche zur Identifizierung des defekten Translokationsschrittes der Y^{59}-Lactose-Permease	112

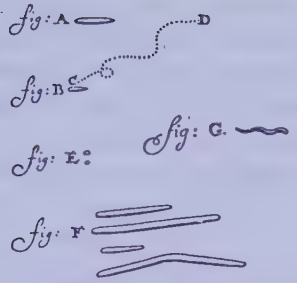
		Seite
3.5.1.	NpαGal-Bindung an Zellen	114
3.5.2.	NpαGal-Bindung an ISO-Vesikel	116
3.5.3.	Interpretation der in 3.5.1. und 3.5.2. dargestellten Ergebnisse	118
4.	Diskussion	121
5.	Zusammenfassung	135
6.	Literaturverzeichnis	137

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen:

Amp^R	Resistenz gegen Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
Cap^R	Resistenz gegen Chloramphenicol
$ClHgBzSO_3$	p-Chloromercuribenzsulfonsäure
cpm	Impulse pro Minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EK	Einzelkolonie
g	Gramm
GalSGal	ß-D-Galactopyranosyl-1-thio-ß-D-galactopyranosid
h	Stunde
Hg-UTP	Uridin-5'-triphosphat-5-mercuri-trihydrat
Kb	Kilobasenpaare
l	Liter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MW	Molekulargewicht
Nal^R	Resistenz gegen Nalidixinsäure
NEtMal	N-Ethylmaleimid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NpαGal	p-Nitrophenl-α-D-galactopyranosid
NpßGal	o-Nitrophenyl-ß-D-galactopyranosid

OD	Optische Dichte
PrSGal	Isopropyl-ß-D-thiogalactosid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tet^R	Resistenz gegen Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolettes Licht
Upm	Umdrehungen pro Minute
w/v	Gewichtsprozent
x-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactosid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

1. Einleitung



„Ich erblickte dann fast immer mit großer Verwunderung, daß sich in besagtem Stoff viele sehr kleine lebende Tierchen befanden, die sich sehr niedlich bewegten. Die größte Sorte hatte die Gestalt von A. Diese bewegten sich sehr kräftig und flink und schossen durch das Wasser (oder den Speichel) wie ein Hecht durchs Wasser. Diese waren zumeist immer wenige an der Zahl.

Die zweite Sorte hatte die Gestalt von B. Diese wirbelten oftmals herum wie ein Kreisel, und ab und zu einmal nahmen sie einen Weg, wie zwischen C und D gezeigt, diese waren weit mehr an der Zahl.

Von der dritten Sorte konnte ich keine Form angeben; denn manchmal schienen sie länglich zu sein, während sie alsobald wieder vollkommen rund aussahen. Diese waren so klein, daß ich sie nicht größer als in E sehen konnte, doch überdies eilten sie so behende voran und schwebten so zusammen, daß man sich hätte einbilden können, sie seien ein großer Schwarm Mücken oder Fliegen, die aus und ein und umeinander schwirrten."

(Aus Leeuwenhoeks Brief vom 17. September 1683)

Die Mikrobiologie, die Wissenschaft von den Mikroorganismen, hat ihre Anfänge in den Beobachtungen des Niederländers Antonie van Leeuwenhoek, der in seinem Brief an die Royal Society in London im September 1683 zum ersten Mal Bakterien beschrieb.

Wegen dem relativ einfachen Zellaufbau und der relativ unkomplizierten Struktur des genetischen Materials sowie der hohen physiologischen Flexibilität und Vielseitigkeit sind Bakterien, die mit den Blaualgen die Gruppe der Procaryonten bilden, bestens für die Erforschung von zellphysiologischen Vorgängen geeignet.

UNIV. LEIDEN

Auffälligstes Merkmal der procaryontischen Organisationsstufe ist eine fehlende Kompartimentierung des Zellinneren durch Membranen. So liegt die DNA frei in der Zelle (sog. Kernäquivalent oder Nucleoid). Echte Chromosomen, wie sie bei der Kernteilung bei Eucaryonten auftreten, können von Protocyten nicht gebildet werden.

Die am eingehendsten untersuchte Protocyte ist dabei Escherichia coli (E. coli), ein gramnegatives Bakterium, welches der zur Zeit besterforschte Organismus überhaupt ist.

Das Zellinnere von E. coli, das Cytoplasma, ist von einer Zellhülle umgeben, die mehrlagig aufgebaut ist (Abb. 1).

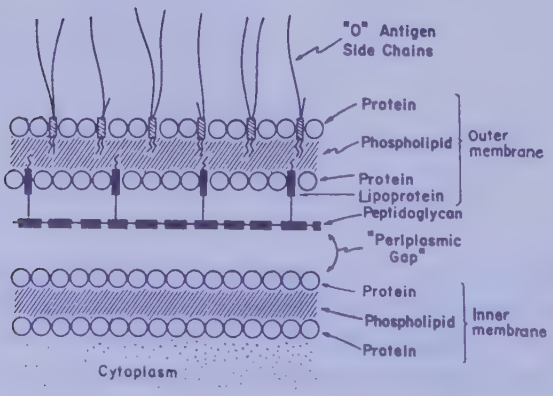


Abb. 1: Schematische Darstellung der Zellhülle von Escherichia coli (aus (52))

Die innere Begrenzung, die cytoplasmatische Membran, steht in direktem Kontakt mit dem Cytoplasma. Sie ist nach dem Prinzip einer Elementarmembran (unit membrane) aufgebaut, d. h., es handelt sich um eine Lipiddoppelschicht, in die Proteine eingebettet (integrale Proteine) und angelagert (periphere Proteine) sind. Dieses 1972 von Singer und Nicolson vorgeschlagene "fluid-mosaic-model" (55) berücksichtigt besonders die Tatsache, daß die Membran kein starres, (rigides) Gebilde ist, sondern dynamische (fluide) Eigenschaften besitzt.

An die Cytoplasmamembran schließt sich die für die Zellstabilisierung und Formgebung der Zelle dienende Zellwand an. Es handelt sich um den Murein-Sacculus, ein im wesentlichen aus Glucosamin, Mureinsäure und kurzen Peptiden bestehendes netzförmiges Riesenmolekül.

Dem Murein ist eine weitere, im Elektronenmikroskop als Doppelmembran erscheinende Schicht, die äußere Membran, aufgelagert. Der Raum zwischen äußerer und innerer Membran wird periplasmatischer Raum oder kurz Periplasma genannt. Hauptbestandteile der äußeren Membran sind Lipopolysaccharide, Phospolipide und wenige Proteine (z. B. Braun'sches Lipoprotein).

Dieser Aufbau der Zellhülle ist auch für das Verhalten bei einer von Gram 1884 eingeführten Färbetechnik verantwortlich. Bakterien, die sich nach dieser Methode färben lassen, also grampositiv sind, fehlt eine äußere Membran. Zusätzlich ist ihre Mureinschicht im Vergleich zu dem einschichtigen Mureinnetz der gramnegativen Bakterien mehrschichtig, bis zu 40 Lagen.

Die funktionellen Eigenschaften dieser drei Lagen der Zellhülle gramnegativer Bakterien sind ganz verschieden. Die äußere Membran schützt weitgehend vor extracellulären hydrolytischen Aktivitäten und stellt für viele Substanzen eine Diffusionsbarriere dar. Die Permeabilitätseigenschaften der

äußeren Membran sind dabei auf eine Gruppe von Proteinen zurückzuführen, sog. Porine, bei denen es sich prinzipiell um Wasser gefüllte Poren mit geringer Spezifität handelt. Man kann sie als Molekülsiebe betrachten, die Moleküle ab einer bestimmten Größe nicht mehr permeieren lassen (MW > 600). Ferner ist die äußere Membran am Prozeß der Zellteilung und Konjugation sowie an der Septenbildung der Bakterien beteiligt.

Der periplasmatische Raum enthält Proteine, die sowohl für den Transport von Molekülen durch die Zellhülle verantwortlich sind als auch für chemotaktische Vorgänge. Das Mureinnetz ist für die meisten Stoffe frei permeabel. Seine Funktion besteht darin, dem in Zellinneren herrschenden osmotischen Druck entgegenzuwirken. Dies hat zur Folge, daß die cytoplasmatische Membran fest an das Murein gepreßt wird.

Die innere Membran, die Plasmamembran, besteht zu etwa 1/3 aus Phospholipiden und zu 2/3 aus Proteinen. Sie stellt die eigentliche Barriere für Moleküle zwischen dem Cytoplasma und der Zellumgebung dar. Daneben hat die Cytoplasmamembran noch andere Aufgaben zu übernehmen, die in eucaryontischen Zellen auf die Organellenmembranen und das endoplasmatische Retikulum verteilt sind. Sie enthält die Enzyme der Atmungskette, der Oxydativen Phosphorylierung, sowie biosynthetische Systeme, die für die Synthese von Membrankomponenten benötigt werden.

Da die Zelle als offenes System auf ständigen Materialaustausch mit der Umgebung angewiesen ist, tritt neben die Barrierefunktion eine Transport-Funktion der Plasmamembran. Die in der cytoplasmatischen Membran enthaltenen spezifischen Transportproteine wählen aus den angebotenen Ionen und Molekülen jene Permeanden aus, welche die Zelle benötigt bzw. ausscheiden muß. Diese Transportsysteme sorgen für eine Akkumulation der Nahrungsstoffe im Zellinneren. Daher sind die bekannten Transportsysteme von E. coli, die

den Transport von Molekülen gegen einen Konzentrationsgradienten ermöglichen, in der Regel energieabhängig.

In E. coli sind annähernd 100 verschiedene solcher Transportsysteme in der cytoplasmatischen Membran eingelagert. Generell kann man zwischen folgenden Systemen unterscheiden.

Eine Gruppe von Transportsystemen koppelt den Transport über die Membran mit einer chemischen Modifikation des Moleküls, ein Vorgang, der Gruppentranslokation genannt wird. Ein Beispiel hierfür ist das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferasesystem (PEP-abh. PTS), welches durch Phosphorylierung von Zuckern (mit PEP als P_i-Donor) die chemische Energie der modifizierenden Reaktion (P_i-Übertragung auf das Zuckermolekül) als Energiequelle für den Translokationsschritt benützt (16). Dieses System ist auch ein Beispiel für vektoriellen Transport, da nur unmodifizierter Zucker von außen gebunden wird und das Produkt, der phosphorylierte Zucker, nur ins Zellinnere abgegeben werden kann.

Die bei der Hydrolyse von ATP oder anderen energiereichen Verbindungen freiwerdende Energie wird von anderen Systemen zum Transport genutzt, ohne daß es zu einer Modifikation des Substrats kommt. Die Transportfähigkeit dieser Proteine hängt dabei von sog. "bindenden Proteinen" ab. Dies sind lösliche Proteine, die im periplasmatischen Raum zwischen innerer und äußerer Membran zu finden sind und spezifisch das Substrat der membrangebundenen Transportproteine binden. Da diese bindenden Proteine schwach an die Außenseite der inneren Membran gebunden zu sein scheinen, können sie durch milden osmotischen Schock entfernt werden, wodurch die Transaktivität erniedrigt wird. Dies hat auch zu der Bezeichnung "gegen osmotischen Schock sensitive Transportsysteme" geführt (16). Ungefähr 40 % aller bekannten Transportsysteme von E. coli gehören zu dieser Gruppe von Transportsystemen.

Gemeinsam ist diesen beiden Gruppen von Transportsystemen, daß sie ihre Transportaktivität, also die Konzentrierung von Substrat im Zellinneren, nur durch direkten Verbrauch energiereicher Stoffwechselprodukte aufrechterhalten können.

Dies ist ein wesentlicher Unterschied zu einer weiteren Gruppe membrangebundener Transportproteine, welche die für den Transport von Substrat notwendige Energie aus einem Ionengradienten, der senkrecht über der Membran liegt, bezieht. Zum Aufbau solcher Ionengradienten (H^+- oder Na^+-Gradienten) wird Stoffwechselenergie in Form engergiereicher Verbindungen wie ATP verwendet, so daß solche Transportsysteme indirekt chemisch gespeicherte Energie für ihre Funktion verbrauchen.

Eine Erklärung für die Kopplung zwischen der in einem Ionengradienten gespeicherten Energie und energieverbrauchenden Prozessen bietet die chemiosmotische Theorie von Mitchell (31). Diese Theorie besagt, daß energieumwandelnde Systeme wie Elektronentransportketten und ATPasen als elektrogene Pumpen wirken. In der Cytoplasmamembran sind diese Protonenpumpen asymmetrisch angeordnet; sie bewegen Protonen von der cytoplasmatischen Seite über die Membran in das umgebende Medium. Da die Plasmamembran für Ionen und insbesondere für Protonen und Hydroxylionen praktisch impermeabel ist, resultieren aus dieser Protonentranslokation zwei Gradienten. Zum einen bildet sich ein chemischer Gradient wegen der ungleichen Protonenverteilung innerhalb und außerhalb der Zelle (ΔpH, innen alkalisch, außen sauer wegen höherer Protonenkonzentration), zum anderen kommt es durch den Transport von H^+-Ionen zum Aufbau eines elektrischen Potentials ($\Delta\Psi$, außen positiv). Beide Gradienten üben eine nach innen gerichtete Kraft auf die Protonen aus, die sog. protonentreibende Kraft (proton motive force, pmf oder $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$).

Diese Kraft läßt sich durch die Gleichung

$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = \Delta\Psi - Z\Delta pH$$

$$Z = \frac{2.3RT}{F}$$

beschreiben.

Die wichtigsten energieliefernden Prozesse in Zellen, die Atmung und die Absorption von Licht in chlorophyllhaltigen Zellen, sind demnach Transportsysteme, die chemische Energie oder Lichtenergie in elektrochemische Energie überführen. Die in dem elektrochemischen Gradienten gespeicherte Energie kann dann nach der chemiosmotischen Theorie für energieverbrauchende Prozesse in der Membran durch einen Rückfluß an Protonen genutzt werden. Die Energie von $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ wird entweder für die Synthese von ATP durch die ATP-Synthetase verwendet oder für die Akkumulation von Molekülen in der Zelle. Je nach Art des transportierten Moleküls handelt es sich dabei um einen Symport (Substrat und Proton werden in die gleiche Richtung transportiert) oder Antiport (entgegengesetzter Transport von Substrat und Proton).

Daneben ist $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ noch an vielen anderen physiologischen Vorgängen beteiligt wie Geißelbewegung, Empfindlichkeit und Resistenz gegenüber Antibiotika u. a..

Eines der besten untersuchten Symportsysteme ist das ß-Galactosid-Transportsystem von E. coli. Dieses Transportsystem, wegen seines natürlichen Substrats auch Lactose-Transportsystem genannt, wird vom Lactose-Operon (lac-Operon) codiert. Das lac-Operon (Abb. 2) besteht aus drei Strukturgenen:

A-Gen: codiert für Thiogalactosidtransacetylase, ein Enzym ohne bekannte physiologische Funktion

Y-Gen: codiert für das eigentliche membrangebundene Transportprotein, den Lactose-Carrier oder Lactose-Permease bzw. M-Protein

Z-Gen: codiert für ß-Galactosidase, ein cytoplasmatisches Enzym, welches Lactose in Glucose und Galactose spaltet.

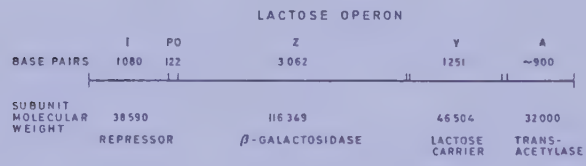
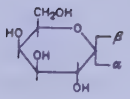
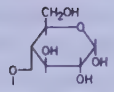


Abb. 2: Lactose-Operon von E. coli (aus (67))

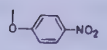
Die drei Strukturgene stehen dabei unter der Kontrolle des I-Gens, des Repressorgens. Das Produkt von I, der Repressor, verhindert durch Blockieren des Operators die Transkription des Operons. Eine Synthese der vom lac-Operon codierten Proteine ist nur in Anwesenheit eines Induktors möglich. Dieser inaktiviert das Repressorprotein durch Bindung, so daß eine Blockierung des Operons durch den Repressor nicht mehr möglich ist; die Transkription der Strukturgene ist jetzt, im induzierten Zustand, möglich. Neben dem natürlichen Induktor des lac-Operons, Lactose (bzw. Allolactose), gibt es noch eine Reihe anderer künstlicher Induktormoleküle, die effektiver wirken und nicht metabolisiert werden wie z. B. PrSGal (Isopropyl-ß-D-thiogalactosid).

Die Lactose-Permease erkennt außer ihrem eigentlichen Substrat Lactose noch eine ganze Reihe anderer α- und ß-Galctoside, wobei alle Substrate einen Galactosid-Rest als gemeinsames Erkennungselement aufweisen (Abb. 3).



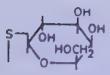


Lactose



NpαGal

NpßGal



GalSGal

PrSGal

Abb. 3: Substrate der Lactose-Permease

Bei der Lactose-Permease handelt es sich um ein sehr hydrophobes Protein (MW 46 500). Von den 417 Aminosäuren, aus denen die Permease aufgrund der bekannten DNA-Sequenz besteht, sind 71 % apolar (5).

Aufgrund des nach der Aminosäuresequenz erstellten hydrophatischen Profils der Permease und Ergebnissen, die mit isolierter und gereinigter Permease mittels Circulardichroismus erhalten wurden, lassen sich 8-13 mögliche hydrophobe α-Helices vorhersagen, die in der Membran eingelagert sein sollen (12) (37).

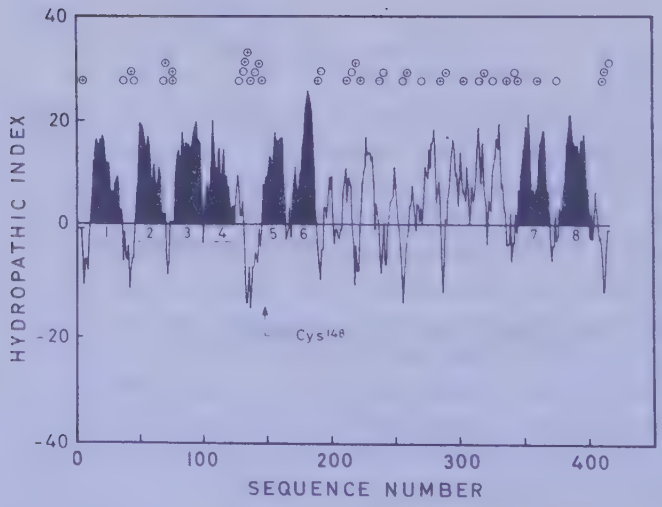


Abb. 4: Hydropathisches Profil der Lactose-Permease, welches 8 mögliche hydrophobe α-Helices sowie die Verteilung der geladenen Aminosäuren zeigt (aus (38))

Antikörper, die gegen das synthetische C-terminale Dekapeptid gerichtet sind, zeigen, daß das C-terminale Ende der Permease der cytoplasmatischen Seite zugewandt ist (54). Gleiches soll für den N-terminalen Bereich des Proteins gelten (15) (37).

Die für die Bindung von Substrat verantwortliche Bindungsstelle scheint dabei nicht direkt dem periplasmatischen Raum zugewandt sein (30) (53). Wichtig für die Substratbindung in einer noch immer unbekannten Art ist dabei das Cystein 148. Nach Modifikation der SH-Gruppe dieses Cysteins mit SH-spezifischen Reagenzien wie NEtMal (N-Etylmaleimid) oder Hg-Verbindungen ist keine Substratbindung mehr möglich und damit natürlich auch kein Transport. Entsprechend läßt sich aber durch Substratbindung diese SH-Gruppe vor Modifikation schützen (2).

Nach der chemiosmotischen Theorie handelt es sich beim ß-Galactosid-Transport um einen Symport, d. h., pro transportiertem Galactosidmolekül wird ein Proton über die Membran transportiert (61) (62). Pro Carriermolekül, das aus einer Polypeptidkette besteht, wird ein Molekül Substrat und ein Proton gebunden und transportiert (17) (36). Substrat und Proton binden dabei spontan und unabhängig voneinander (65). Für jedes Substrat der Lactose-Permease läßt sich in nichtenergetisierten Zellen oder Membranvesikeln (21) ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = 0$) eine charakteristische Dissoziationskonstante (Bindungskonstante) K_D bestimmen, die für Np∝Gal und GalSGal niedrig ist, während Lactose als natürliches Substrat mit sehr geringer Affinität gebunden wird ($K_D^{Lac} = 14$ mM) (65). Findet Transport statt ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+} \neq 0$), so kann man entsprechend ein K_T definieren als Halbsättigungskonstante des aktiven Transports.

Für einige Substrate wie Np∝Gal und GalSGal ist dabei $K_D = K_T$, während für Lactose der K_T-Wert bedeutend kleiner ist als das K_D, nämlich 0.2 mM. Eine mögliche Erklärung für diese

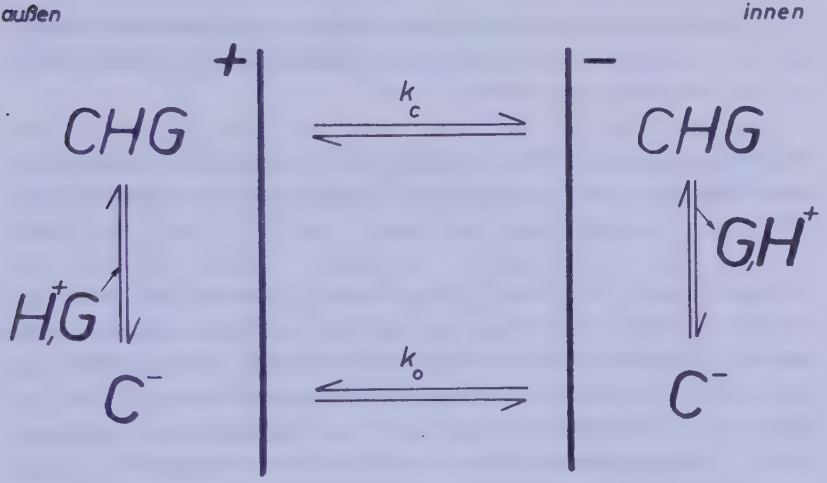
Diskrepanz wäre ein "Mobilitätseffekt", hervorgerufen durch $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, d. h. $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ beeinflußt die Bewegung des beladenen Carriers in der Membran, oder ein "Affinitätseffekt", d. h., durch $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ kommt es zu einer Konformationsänderung des Carriers, die eine erhöhte Affinität für Lactose bewirkt.

Die Bindung von Lactose und anderen Substraten ist dabei relativ unabhängig vom pH-Wert des umgebenden Mediums im Bereich von pH 5-8. Für das cotranportierte Proton läßt sich ein pK-Wert von 8-10.3 bestimmen, so daß der Carrier im physiologischen pH-Bereich protoniert vorliegt (40) (65) (68).

Zahlreiche Untersuchungen zur Kinetik des ß-Galactosid-Transports wurden erst möglich durch Konstruktion eines rekombinanten Plasmids, welches ein funktionelles Y-Gen trägt (58) (59). Durch dieses Plasmid wird der Anteil an Lactose-Permease in der Cytoplasmamembran von etwa 1 % (eine Genkopie auf dem Chromosom oder einem F'-Faktor) auf 10-20 % erhöht.

Solche Lactose-Permease-überproduzierende E. coli-Stämme waren auch Grundlage für die Isolierung der Permease in aktiver Form sowie die Rekonstitution in Liposomen, wobei sich im rekonstituierten System wie in Zellen oder Vesikeln Bindung und Transport nachweisen lassen (33) (67).

Aufgrund der kinetischen Untersuchungen läßt sich ein prinzipielles Schema des ß-Galactosid-Transportes entwerfen (38):



Der Carrier (C^-), der formal negativ geladen ist (22), bindet ein Proton (H^+) und ein Galactosidmolekül (G) unabhängig voneinander. Nach Umorientierung des ternären neutralen Komplexes CHG (k_c-Schritt) erfolgt auf der Innenseite die Freisetzung der Substrate H^+ und G ins Cytoplasma. Durch Reorientierung des unbeladenen Carriers nach außen (k_o-Schritt) sind die Bindungsstellen wieder für das Proton und das Galactosid zugänglich und der Zyklus kann erneut beginnen. Da sämtliche Schritte des Transportzyklus reversibel sind, kann die Lactose-Permease auch den Transport von H^+ und G von innen nach außen katalysieren (Efflux); die Aktivität des Carriers ist demnach symmetrisch. Bei fehlendem $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ ist keine Akkumulation von Substrat möglich, es findet nur noch erleichterte Diffusion über den Carrier statt bis zum Konzentrationsausgleich ($G_{innen} = G_{außen}$).

Liegt ein Membranpotential an der Membran an (innen negativ), so führt die formal negative Ladung des Carriers zur Anhäufung des unbeladenen Carriers auf der Außenseite ($C^-_{außen} > C^-_{innen}$) (22). Im physiologischen pH-Bereich sind dabei sämt-

liche Dissoziations- und Translokationskonstanten pH-unabhängig (65).

Um den Translokationsmechanismus der Lactose-Permease molekular aufzuklären, muß man Wechselbeziehungen zwischen Struktur und Funktion aufstellen.

Die Struktur der Permease läßt sich dabei durch chemische Modifikation durch Behandlung mit spezifischen Reagenzien ändern.

Bestes Beispiel für eine chemische Modifikation der Lactose-Permease ist die Behandlung mit NEtMal, welches durch Blockierung der SH-Gruppe des Cysteins 148 Bindung und Transport von Substrat verhindert; ein Effekt, der ursprünglich zur Entdeckung der Permease geführt hat (14). Diethylpyrocarbonat (DEPC), welches spezifisch Histidin-Reste modifiziert, verhindert ebenfalls Bindung und Transport von Substrat (38). Anderen Untersuchungen jedoch zufolge ist nach DEPC-Behandlung von Permease-haltigen Membranvesikeln noch Bindung von NpαGal möglich, nicht aber mehr aktiver Transport; nachweisen läßt sich nur noch erleichterte Diffusion. Aus diesen Beobachtungen wurde dann gefolgert, daß DEPC die Protonen-Bindungsstelle modifiziert (39) (43).

Neben einer Änderung der Struktur der Lactose-Permease durch chemische Modifikation kann auch eine Strukturänderung der Permease durch Änderung in der Nukleotidsequenz des lacY-Gens herbeigeführt werden.

Mutationen im Y-Gen führen entweder zu Permease-Molekülen, die weder Transport noch Bindung von Substrat zeigen oder zu Y-Mutanten, die einen (oder mehrere) funktionellen Defekt aufweisen.

So ist eine Y-Mutante beschrieben worden, die noch erleichterte Diffusion zeigt, aber zur Akkumulation von Substrat

nicht mehr fähig ist, da die Mutation im Y-Gen eine Veränderung der Bindungsstelle für das Proton hervorgerufen haben soll. Da die Galactosid-Bindung völlig intakt ist, ist kein gekoppelter Protonen-Galactosid-Transport möglich und damit auch keine aktive Aufnahme von Substrat (63) (64).

Die Kartierung dieser Mutante zeigt, daß die Mutation entweder in der Deletionsgruppe XXXVI des Y-Gens liegt oder im Bereich zwischen dem Y-Gen und dem A-Gen (17). Neueren Untersuchungen zufolge verfügt diese mutierte Lactose-Permease über einen intakten C-Terminus, so daß die für den Phänotyp verantwortliche Mutation wahrscheinlich vor der Deletionsgruppe XXXVI liegt (K. Wright, persönl. Mitteilung). Eine andere mögliche Erklärung für den entkoppelten Phänotyp wäre, daß diese mutierte Lactose-Permease nicht mehr mit einem sog. Protonen-bindenden Protein wechselwirken kann. Dieser hypothetische "energy coupling factor" als Genprodukt des eup-Genortes (kartiert bei min 86 auf dem E. coli-Chromosom) soll für die Protonenbeladung des Lactose-Carriers verantwortlich sein (45). Diese Erklärung ist allerdings rein hypothetisch, da über das eup-Genprodukt nichts bekannt ist und Rekonstitutionsversuche mit gereinigter aktiver Lactose-Permease zeigen, daß für den Galactosidtransport unter energetischen Bedingungen kein anderes Protein als Cofaktor für die Kopplung von Galactosid- und Protonentransport notwendig ist (67).

Eine andere Gruppe von Y-Mutanten mit einem definierten phänotypischen Defekt ist nicht in der Lage, auf Agar-Platten mit 5 mM Lactose (normale Konzentration) zu wachsen, wohl aber auf Platten mit hoher Lactose-Konzentration (100 mM Lactose). Diese Mutanten, Y^{-K} genannt, scheinen veränderte Bindungskonstanten für Substrat und/oder H^+-Ionen zu besitzen. Genetisch kartieren alle Y^{-K}-Mutanten im 3'-Ende des lacY-Gens (Deletionsgruppe XXV-XXXV) bis auf eine Y^{-K}-Mutante, die in Deletionsgruppe III kartiert. Aufgrund der Kartierung wurde gefolgert, daß im Bereich ab Aminosäure 150 die Substratbindungsstelle lokalisiert ist, während die Protonenbindungsstelle mehr im N-terminalen Bereich des Proteins liegen soll (27).

Ausgehend von dem für Lactose beobachteten $K_D \rightarrow K_T$-Effekt unter Einfluß von $\Delta\tilde{\mu}_H^+$ wurde gefolgert, daß $\Delta\tilde{\mu}_H^+$ eine Dimerisierung des Lactose-Carriers bewirkt, während unter nichtenergetisierten Bedingungen ($\Delta\tilde{\mu}_H^+ = 0$) der Carrier als Monomer in der Membran vorliegt (42). Demnach müßte, wenn eine dimere (oder oligomere) Struktur des Carriers für den aktiven Transport notwendig ist, der Ersatz einer (oder mehrerer) Untereinheit(en) durch ein funktionsloses Monomer die Aktivität des Carrier-Komplexes herabsetzen. Ein solcher negativer Dominanzeffekt wurde u. a. für das Repressorprotein, welches aus vier Untereinheiten besteht, beschrieben (I^{-d}-Mutanten) (29).

Ausgehend von einem Y^+-Stamm wurden vier solcher Mutanten isoliert, die in einem Y^+-Hintergrund einen negativen dominanten Effekt ausüben sollen und deswegen in Analogie zu den I^{-d}-Mutanten als Y^{-d}-Mutanten bezeichnet werden (27). Die Kartierung ergab, daß $Y^{-d}1$ in Deletionsgruppe V, $Y^{-d}2$- in Deletionsgruppe XXI und $Y^{-d}3/4$ in Deletionsgruppe XXVIII kartieren. Letztere erwiesen sich als identisch und zeigen einen Austausch von $Gly^{262} \rightarrow Asp$. Die Interpretation der Y^{-d}-Mutanten entspricht der Y^{-K}-Mutanten, daß nämlich $Y^{-d}1$ einen Defekt in der Protonenbindungsstelle aufweisen soll, während $Y^{-d}2$ und $Y^{-d}3/4$ in der Substratbindungsstelle mutiert sein sollen (27).

Aufgabenstellung

Nach in vitro Mutagenese des rekombinanten Plasmids pTE 18 (59) wurden die nach Transformation erhaltenen Lac^--Mutanten auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Substrat zu binden und zu transportieren.

Es wurde eine lacY-Mutante gefunden, die sich durch die Eigenschaft, Substrat zu binden, aber nicht mehr zu transportieren, auszeichnete.

Die kinetische und genetische Charakterisierung dieser Mutante, die zum Verständnis des Translokationsmechanismus der Lactose-Permease beitragen sollte, war Aufgabe dieser Arbeit.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Escherichia coli Stämme

Die Nomenklatur richtet sich nach den Empfehlungen von Bachman et al. (1). Mit UW bezeichnete Stämme wurden von mir konstruiert; bei allen anderen in dieser Arbeit verwendeten Stämme ist die jeweilige Herkunft angegeben.

2.1.1. Escherichia coli Stämme

Escherichia coli Stämme

	lac Genotyp			Lac	andere Marken			
Stamm	Chromosom	F'	Plasmid	Phänotyp	Chromosom	F'	Plasmid	Herkunft (Referenz)
ML308-225	$I^-O^+Z^-Y^+$	-	-	$I^-O^+Z^-Y^+$	-	-	-	P. Overath
T126	Δ(lac)	$I^+O^+\Delta(Z)Y^+$	-	$I^+O^+Z^-Y^+$	Δ(pro)	pro^+	-	" "
T27RT	$I^+O^+Z^+Y^-$	-	-	$I^+O^+Z^+Y^-$	recA hsdM hsdR met thr rpsl pro	-	-	" "
T44RT	$I^+O^+Z^+Y^-$	$I^+O^+\Delta(Z)Y^+$	-	$I^+O^+Z^+Y^+$	(T27RT)	pro^+	-	" "
T215	$I^+O^+Z^+Y^-$	$I^qO^+Z^+\Delta(Y)$	-	$I^qO^+Z^+Y^-$	(T27RT)	pro^+	-	" "
T217	$I^+O^+Z^+Y^-$	$I^qO^+Z^+\Delta(Y)$	$\Delta(I)O^+\Delta(Z)Y^+$	$I^qO^+Z^+Y^+$	(T27RT)	pro^+	Tet^R	" "
T219	$I^+O^+Z^+Y^-$	$I^qO^+Z^+\Delta(Y)$	$\Delta(I)O^+\Delta(Z)Y^{59}$	$I^qO^+Z^+Y^-$	(T27RT)	pro^+	Tet^R	" "
T184	$I^+O^+Z^-Y^-$	$I^qO^+Z^{U118}(Y^+)$	-	$I^qO^+Z^-Y^-$	(T27RT)	pro^+	-	" "
T206	$I^+O^+Z^-Y^-$	$I^qO^+Z^{U118}(Y^+)$	$\Delta(I)O^+\Delta(Z)Y^+$	$I^qO^+Z^-Y^+$	(T27RT)	pro^+	Tet^R	" "
T213	$I^+O^+Z^-Y^-$	$I^qO^+Z^{U118}(Y^+)$	$\Delta(I)O^+\Delta(Z)Y^{59}$	$I^qO^+Z^-Y^-$	(T27RT)	pro^+	Tet^R	" "

Escherichia coli Stämme

	lac Genotyp			Lac	andere Marken			
Stamm	Chromosom	F'	Plasmid	Phänotyp	Chromosom	F'	Plasmid	Herkunft (Referenz)
T23UW	$I^+O^+Z^+Y^-$	$I^qO^+Z^+\Delta(Y)$	$\Delta(I)O^+\Delta(Z)Y^{59}$	$I^qO^+Z^+Y^-$	(T27RT)	pro^+	Amp^R Tet^R	
T24UW	$I^+O^+Z^+Y^-$	$I^qO^+Z^+Y^+$	-	$I^qO^+Z^+Y^+$	(T27RT)	pro^+	-	
T25UW	$I^+O^+Z^+Y^-$	$I^qO^+Z^+Y^+$	$\Delta(I)O^+\Delta(Z)Y^{59}$	$I^qO^+Z^+Y^+$	(T27RT)	pro^+	Tet^R	
T27UW	$I^+O^+Z^+Y^-$	$I^qO^+Z^+\Delta(Y)$	-	$I^qO^+Z^+Y^-$	(T27RT)	pro^+	Cap^R Tet^R	
T28UW	$I^+O^+Z^+Y^-$	$I^+O^+\Delta(Z)Y^+$	$\Delta(I)O^+\Delta(Z)Y^{59}$	$I^+O^+Z^+Y^+$	(T27RT)	pro^+	Tet^R	
T30UW	$I^+O^+Z^+Y^-$	$I^qO^+Z^+\Delta(Y)$	$\Delta(I)O^+\Delta(Z)Y^+$ FN18+FC59	$I^qO^+Z^+Y^+$	(T27RT)	pro^+	Amp^R Tet^R	
T31UW	$I^+O^+Z^+Y^-$	$I^qO^+Z^+\Delta(Y)$	$\Delta(I)O^+\Delta(Z)Y^{59}$ FC18+FN59	$I^qO^+Z^+Y^-$	(T27RT)	pro^+	Amp^R Tet^R	
T32UW	Δ(lac)	$I^+O^+\Delta(Z)Y^+$	-	$I^+O^+Z^-Y^+$	Δ(pro)	pro^+	-	
T34UW	Δ(lac)	$I^+O^+\Delta(Z)Y^{59}$	-	$I^+O^+Z^-Y^-$	Δ(pro)	pro^+	-	
T35UW	Δ(lac)	$I^+O^+\Delta(Z)Y^{59R}$	-	$I^+O^+Z^-Y^+$	Δ(pro)	pro^+	-	
T36UW	$I^+O^+Z^+Y^-$	$I^qO^+Z^+\Delta(Y)$	$\Delta(I)O^+\Delta(Z)Y^{59R}$	$I^qO^+Z^+Y^+$	(T27RT)	pro^+	Amp^R Tet^R	
T37UW	$I^+O^+Z^-Y^-$	$I^qO^+Z^{U118}(Y^+)$	$\Delta(I)O^+\Delta(Z)Y^{59R}$	$I^qO^+Z^-Y^+$	(T27RT)	pro^+	Amp^R Tet^R	

Escherichia coli Stämme

Stamm	lac Genotyp Chromosom	F'	Plasmid	lac Phänotyp	andere Marken Chromosom	F'	Plasmid	Herkunft (Referenz)
DP90CNal	Δ(lac)	-	-	$I^-O^-Z^-Y^-$	Δ(pro)	-	-	B. Müller-Hill
X90	Δ(lac)	$I^qO^+Z^+Y^+$	-	$I^qO^+Z^+Y^+$	Δ(pro)	pro^+	-	H. A. Shuman
HB1	Δ(lac)	$I^qO^+Z^+Y^+$	-	$I^qO^+Z^+Y^+$	Δ(pro)	pro^+	-	H. Bocklage
HB2	Δ(lac)	$I^qO^+Z^+Y^+$	$\Delta(I)O^+\Delta(Z)Y^+$	$I^qO^+Z^+Y^+$	Δ(pro)	pro^+	Amp^R	" "
HB3	Δ(lac)	$I^qO^+Z^+Y^+$	$\Delta(I)O^+\Delta(Z)Y^{-d3}$	$I^qO^+Z^+Y^+$	Δ(pro)	pro^+	Amp^R	" "
71-56-10	Δ(lac)	I^qZY^+	-	$I^qZ^+Y^+$	Δ(pro)	pro^+	-	" "
71-56-10pY^{-d3}	Δ(lac)	I^qZY^+	$\Delta(I)O^+\Delta(Z)Y^{-d3}$	$I^qZ^+Y^-$	Δ(pro)	pro^+	Amp^R	" "

2.1.2. Plasmide

Plasmide

	lac Genotyp			Lac	andere Marken			
Plasmid	Chromosom	F'	Plasmid	Phänotyp	Chromosom	F'	Plasmid	Herkunft (Referenz)
pACYC184	-	-	-	-	-	-	Cap^R Tet^R	(7)
pGM21	-	-	$\Delta(I)O^+P^+\Delta(Z)Y^+$	$I^-O^+Z^-Y^+$	-	-	Tet^R	(59)
pGM21/59	-	-	$\Delta(I)O^+P^+\Delta(Z)Y^{59}$	$I^-O^+Z^-Y^-$	-	-	Tet^R	P. Overath
pBR322	-	-	-	-	-	-	Amp^R Tet^R	(4) (57)
pTE18	-	-	$\Delta(I)O^+P^+\Delta(Z)Y^+$	$I^-O^+Z^-Y^+$	-	-	Amp^R Tet^R	(59)
pTE18/59	-	-	$\Delta(I)O^+P^+\Delta(Z)Y^{59}$	$I^-O^+Z^-Y^-$	-	-	Amp^R Tet^R	P. Overath
pTE18/59R	-	-	$\Delta(I)O^+P^+\Delta(Z)Y^{59R}$	$I^-O^+Z^-Y^+$	-	-	Amp^R Tet^R	diese Arbeit

2.1.3. Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

Bachem, Schweiz	PrSGal
Bayer AG, Leverkusen	Ampicillin (Binotal)
Biolabs, USA	15 Bp Primer
	Restriktionsenzyme Acc I
	Ava I
	Sma I
Biorad, USA	Agarose Standard Low M_r
Boehringer GMBH, Mannheim	Desoxyribonukleotide
	Didesoxyribonukleotide
	Lysozym
	Polymerase I aus E. coli (Klenow-Fragment)
	Restriktionsenzyme Alu I
	Bam HI
	Cla I
	Eco RI
	Pvu II
Calbiochem	Hg-UTP
Difco Laboratories, USA	Agar
	Bacto Trypton
	Bacto Yeast Extrakt
Hoechst, Frankfurt	Tetracyclin (Reverin)
New England Nuclear	^{32}P-ATP
Serva, Heidelberg	Bromphenolblau
	Chloramphenicol
	Ethidiumbromid
	SDS
	Triton-X-100
	Xylencyanol
Sigma, München	BSA
	$ClHgBzSO_3$
	DTT
	Melibiose
	NEtMal
	x-gal

Whatman Ltd., England	DEAE 52-Cellulose
Zinsser, Frankfurt	Quickszint 212

Die Synthese von

$[6,6'-^{3}H_{2}]$GalSGal
$[6-^{3}H]$NpαGal
$[6-^{3}H]$Lactose

erfolgte nach der Methode von Kennedy et al.
(J. Biol. Chem. 249, 33 - 37, 1974)

2.1.4. Nährlösungen und Platten

Nährlösungen

Die Angaben beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf 1 l deionisiertes Wasser.

NBA:	Bacto Trypton	10 g
	Bacto Yeast Extrakt	5 g
	NaCl	10 g
YT:	Bacto Trypton	8 g
	Bacto Yeast Extrakt	5 g
	NaCl	5 g
CR:	K_2HPO_4	12 g
	KH_2PO_4	3 g
	$(NH_4)_2PO_4$	2 g
	Spurenelemente	1 ml
Spurenelemente:	$FeCl_3 \times 6H_2O$	0.48 g
	$MnCl_2 \times 2H_2O$	0.28 g
	$CaCl_2 \times 2H_2O$	0.38 g
	$ZnCl_2$	2 g
	H_3BO_3	0.29 g
	$CoSO_4 \times 7H_2O$	0.19 g
T31RT:	Glyzerin 50 %	10 ml
	Methionin (5 mg/ml)	10 ml
	Threonin (")	10 ml auf 1 l CR
	Thiamin (")	2 ml
	$MgSO_4$ 1 M	1 ml

M9-Salze	NH_4Cl	20 g
	NH_4NO_3	4 g
	Na_2SO_4	8 g
	K_2HPO_4	12 g
	KH_2PO_4	4 g
	$MgSO_4 \times 7H_2O$	0.4 g

Platten

Agar-Platten werden mit 15 g Agar pro 1 l Medium angesetzt

EMB-Lactose:	Bacto Trypton	8 g
	Bacto Yeast Extrakt	1 g
	NaCl	5 g
	in 900 ml H_2O lösen und autoklavieren, dann Zugabe von	
	K_2HPO_4 10 %	20 ml
	Eosin 4 %	10 ml
	Methylenblau 0.65 %	10 ml
	Laktose 20 %	50 ml

Minimal-Agar-Platten:	15 Agar in 750 ml H_2O lösen, autoklavieren und Zugabe von	
	M9-Salze	250 ml
	Zuckerlösung	10 ml

YT-Topagar: 7.5 g Agar auf 1 l 1 x YT-Medium

2.1.5. Puffer und Lösungen

100 x TE-Puffer:	Tris/HCl pH 7.5	1 M
	Na_2EDTA	0.1 M
KP_i-Puffer:	K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6.3	50 mM
	$MgSO_4$	1 mM
ß-Galactosidase-Puffer:	NaH_2PO_4 pH 7.0	6.8 g
	$MgCl_2 \times 6H_2O$	0.1 g
	Mercaptoäthanol	0.4 g
	in 250 ml H_2O lösen und mit 5-N-NaOH auf pH 7.0 einstellen	
10 x Elektrophorese-Puffer für Agarosegele:	Tris	242 g
	Na_2EDTA	37.2 g
	Essigsäure (96 %)	57.2 g
	in 5 l H_2O lösen; pH liegt uneingestellt bei 8.0	
10 x TBE-Puffer:	Tris	108 g
	Na_2EDTA	8.3 g
	H_3BO_3	55 g
	in 1 l H_2O lösen; pH liegt uneingestellt bei 8.3	

Lösungen für die Sequenzreaktionen

Stammlösungen der Desoxyribonukleotide: 20 mM in H_2O
Stammlösungen der Didesoxyribonukleotide: 10 mM in H_2O
Lagerung bei -20°C

Schema für die Herstellung der Nukleotid-Mischungen (Angaben in µl):

Nukleotid		T-Mix	C-Mix	G-Mix	A-Mix
dTTP	0.5 mM	5	100	100	100
dCTP	0.5 mM	100	5	100	100
dGTP	0.5 mM	100	100	5	100
ddTTP	10 mM	5			
ddCTP	10 mM		1		
ddGTP	10 mM			1.5	
ddATP	5 mM				1
Tris/HCl pH 8.0	10 mM	200	200	200	100

Chase-Mix: alle Desoxyribonukleotide zu 0.25 mM

Go-Mix:

DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) 5 U/µl	0.3 µl
^{32}P-dATP 800 Ci/mmol 10 µCi/µl	1.3 µl
H_2O	6.7 µl

für 4 Sequenzreaktionen

Stop-Mix:	Formamid (deionisiert)	9.5 ml
	Bromphenolblau	3.0 mg
	Xylencyanol	3.0 mg
	Na_2EDTA 0.5 M	0.4 ml
Sequenzgel 6 %:	38 % Acrylamid (19:1)	9 ml
	Harnstoff	30 g
	10 x TBE-Puffer	6 ml
	H_2O	21.5 ml
	APS 10 %	0.42 ml
	TEMED	0.02 ml

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Aufbewahrung von Bakterien (28)

Um Bakterienstämme für längere Zeit zu lagern, verwendet man "Agar-Stabs" oder Glyzerinkulturen. Als Aufbewahrungsgefäße dienen Glasfläschchen mit Schraubverschluß (Wheaton Glassware, Milville, New Jersey).

Die Lagerung von Agar-Stabs erfolgt am besten bei 4°C im Dunkeln, während Glyzerinkulturen bei -20°C aufbewahrt werden.

Agar-Stab: 10 g Difco Nutrient Broth
5 g NaCl
6 g Difco Agar
in 1 l H_2O lösen, abfüllen und autoklavieren

Glyzerinkultur: 1.5 ml Glyzerin 80 % pro Fläschchen abfüllen und autoklavieren.

2.2.1.2. Anzucht von Bakterienkulturen

Als Ausgangsmaterial für Flüssigkulturen wird eine von einer frischen Agar-Platte abgeimpfte Einzelkolonie im gewünschten Medium suspendiert.

Um Kulturen in Minimalmedium anzusetzen, impft man 5 ml NBA-Medium mit einer Einzelkolonie an, schüttelt für ca. 6 h bei 37°C, verdünnt diese Kultur dann 1/500 in Minimalmedium und läßt über Nacht hochwachsen. Bei Stämmen mit Plasmiden, die Antibiotikaresistenz ausprägen, werden dem Medium die entsprechenden Antibiotika zugesetzt:

Ampicillin (Binotal) : 20 µg/ml
Tetracyclin (Reverin) : 10 µg/ml

Die Anzucht erfolgt unter Schütteln in Fernbachkolben (800 ml Kultur pro Kolben) oder, wenn größere Mengen an Kultur benötigt werden, in 5 l-Gefäßen mit Belüftungsrohr bei 37°C.

2.2.1.3. Bestimmung des Zellwachstums

Das Wachstum einer Bakterienkultur läßt sich durch Messen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmen (Gilford Microsample Spectrophotometer). Einer optischen Dichte von $OD_{420} = 1$ entsprechen dabei 2×10^8 Zellen/ml bzw. 0.107 mg Zellprotein/ml (58).

2.2.1.4. Induktion des lac-Operons

Die Induktion des lac- Operons erfolgt in einer wachsenden Kultur bei einem OD von 0.2-0.4 mit PrSGal als Induktor für 2 Generationen (bis OD 0.8-1.6). Stämme mit einem Y^+- Gen werden mit 10^{-4} M PrSGal (Endkonzentration) induziert, Y^{59}- bzw. Y^-- Stämme dagegen mit 5×10^{-4} M PrSGal.

2.2.1.5. F'-Kreuzung (28)

Die Kreuzung eines Episoms in einen F^--Stamm kann in NBA-Medium oder auf einer Agar-Platte durchgeführt werden. Zur Kreuzung in NBA-Medium werden je 0.02 ml des F'-Donors und F^--Rezipienten in 5 ml NBA pipettiert und für 6-8 h bei 37°C angezogen. Nach der Inkubation werden Verdünnungen plattiert. Auf einer Agar-Platte kann in Form einer Strichkreuzung verfahren werden. Dazu wird ein Tropfen des F^--Rezipienten über eine Agar-Platte gezogen. Nach Antrocknen

des Ausstriches wird ein Tropfen des F'-Donors senkrecht über den F^--Rezipienten gezogen. Auf den Agar-Platten darf nur das gewünschte Kreuzungsprodukt wachsen; sie müssen also so beschaffen sein, daß man gegen den F'-Donor und F^--Rezipienten selektioniert. Falls nur eine Selektion gegen den Donor möglich ist, kann der Rezipient durch Kontrolle mit einem "male specific" Phagen wie z. B. M 13 auf das Vorhandensein eines Episoms hin untersucht werden (Rezipienten mit Episom werden durch M 13-Phagen lysiert).

2.2.1.6. Bildung von Homogenoten

Durch Homogenotenbildung ist es möglich, eine Mutation von einem Plasmid auf ein Episom zu kreuzen.

10^4er Verdünnungen der Heterogenoten (F'-Stamm mit Plasmid) werden mindestens dreimal angezogen. Durch Kreuzung in einen F^--Rezipienten wird das Episom mit der Mutation herausgekreuzt. Plattiert wird auf Minimal-Glukose-Platten zur EK; von diesen Platten stempelt man dann auf Selektionsplatten zur Identifizierung.

2.2.1.7. Rekombinationstest zur Kartierung von Mutationen (28)

Zur Kartierung von einer auf einem Episom liegenden Mutation wird das Episom in eine Reihe von Deletionsmutanten gekreuzt, deren Deletionen verschieden tief in das entsprechende Gen hineinragen. Aus einer ÜK der Heterogenoten wird ein Tropfen auf eine Minimal-Platte getropft, auf der nur die Rekombinanten wachsen können. Genmutationen, die auf einem Plasmid liegen, lassen sich kartieren, indem man die Deletionsmutanten mit dem Plasmid transformiert und auf geeigneten Selektionsplatten, die nur ein Wachstum der Rekombinanten ermöglichen, plattiert.

2.2.1.8. Transformation von Bakterien (modifiziert nach (9))

Eine in NBA-Medium gewachsene ÜK des zu transformierenden Stammes wird 1/100 in NBA-Medium verdünnt und bis zu einem OD von 0.5-0.8 inkubiert (logarithmische Wachstumsphase).

Die Zellen werden in sterilen Stahlbechern mit Schraubdeckel abzentrifugiert (5 min bei 10 000 Upm, 4°C, SS 34-Rotor, Sorvall), mit 1/2 Volumen NaCl 0.9 % gewaschen und in 1/3 Volumen kaltem $CaCl_2$ 50 mM resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis für 40 min zentrifugiert man erneut und nimmt die Zellen in 1/30 des Ursprungsvolumen in $CaCl_2$ 50 mM auf. Die zu transformierende DNA wird zu 0.2 ml kompetenter Zellen gegeben und für weitere 40 min auf Eis inkubiert. Durch Hitzeschock (2 min bei 42°C im Wasserbad) erfolgt die DNA-Aufnahme; anschließend werden die Zellen in 1-2 ml NBA-Medium für 1 h bei 37°C geschüttelt. Aus dieser Kultur werden dann Verdünnungen auf geeigneten Platten plattiert.

2.2.1.9. Transfektion von JM 103 mit rekombinanter Phagen-DNA

Nach Verdünnen (1/100) einer ÜK in YT-Medium läßt man die Zellen bis zu einem OD von 0.4-0.6 wachsen, zentrifugiert in sterilen Stahlbechern ab (5 min bei 10 000 Upm, 4°C, SS 34-Rotor, Sorvall) und nimmt die Zellen in 1/2 Volumen kaltem $CaCl_2$ 50 mM auf. Die Zellen werden nach 20 min auf Eis erneut abzentrifugiert und in 1/10 Volumen kaltem $CaCl_2$ 50 mM resuspendiert. Je 0.3 ml kompetenter Zellen versetzt man mit DNA (mehrere Ansätze mit steigender Menge an Vektor-DNA, von 1 ng Vektor-DNA aufwärts) und läßt für 40 min auf Eis stehen. Danach folgt ein Hitzeschock für 2 min bei 42°C. Zum Ausplattieren werden zu den Zellen 3 ml YT-Top-Agar, 0.1 ml einer JM 103 ÜK, 10 µl PrSGal 100 mM und 50 µl x-gal 2 % zupipettiert und auf YT-Agar-Platten ausgegossen.

2.2.1.10. Vermehrung rekombinanter M13-Phagen

Auf x-gal-Platten erscheinen rekombinante M13-Phagen als weiße Plaques, da sie kein -Peptid mehr exprimieren und somit die Komplementation der defekten episomalen ß-Galactosidase der JM 103-Wirtszellen verhindern. Diese weißen Plaques werden mit einer sterilen Pasteur-Pipette ausgestanzt, in 5 ml 2 x YT-Medium resuspendiert und nach Zugabe von 20 µl einer JM 103 ÜK für 5-7 h bei 37°C geschüttelt.

2.2.2. Biochemische Methoden

2.2.2.1. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von Membranpräparationen wird nach der Methode von Peterson (44) bestimmt.

Man verdünnt ein Aliquot der zu bestimmenden Probe (ca. 30-140 µg Protein) in 1 ml H_2O, gibt 1 ml Reagenz A hinzu und läßt die Probe 10 min bei RT stehen. Nach Zugabe von 0.5 ml Reagenz B wird nach 30 min die Absorption bei 727 nm gemessen (Gilford Microsample Spectrophotometer). Mit Hilfe einer Eichkurve (1 mg/ml BSA-Stammlösung) läßt sich der Proteingehalt ermitteln.

Reagenz A: gleiche Volumina an 0.8-N-NaOH
10 % SDS
H_2O
Cu-Tartrat-Carbonat-Lösung
(0.2 % $CuSO_4$
0.4 % K_2-Tartrat
2 % Na_2CO_3)

Reagenz B: 1 Teil Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz auf 5 Teile H_2O

Reagenz A ist nur zwei Wochen haltbar, während Reagenz B sich längere Zeit aufbewahren läßt.

2.2.2.2. Präparation von Zellsuspensionen

Eine ÜK des betreffenden Stammes wird verdünnt, induziert und für zwei Generationen angezogen. Durch Zentrifugation (10 min bei 10 000 Upm, 4°C, GSA-Rotor, Sorvall) werden die Zellen geerntet und anschließend in KP_i-Puffer zweimal gewaschen (200 ml bzw. 40 ml). Der Zellniederschlag wird dann mit KP_i-Puffer homogen resuspendiert.

2.2.2.3. Präparation von Zellmembranen

Aus Zellen, die wie unter 2.2.2.2. beschrieben präpariert werden, lassen sich leicht Membranvesikel isolieren. Da die äußere Membran bei dieser Methode nicht entfernt wird, hat man letztendlich eine Suspension aus cytoplasmatischer Membran und äußerer Membran.

Die Zellen (ca. 2 ml) werden in einem 15 ml Corex-Röhrchen durch Beschallen auf Eis aufgebrochen (3 min, 50-70 W, Branson B-12-Beschaller). Durch niedrigtourige Zentrifugation (20 min bei 4 000 Upm, 4°C, SS 34-Rotor, Sorvall) sedimentiert man nicht aufgeschlossene Zellen. Der Überstand, die Membranen enthaltend, wird anschließend in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (60 min bei 40 000 Upm, 4°C, 50 Ti-Rotor, Beckman). Der so erhaltene Membranniederschlag wird in KP_i-Puffer gewaschen und danach im gewünschten Puffer resuspendiert.

2.2.2.4. Präparation von cytoplasmatischen Membranvesikeln

Mit einer modifizierten Methode von Osborn et al. (34) ist es möglich, aus Sphäroplasten, die aus Zellen durch eine EDTA- und Lysozym-Behandlung gewonnen werden, durch Beschallung und anschließender Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation eine reine cytoplasmatische Membranfraktion zu isolieren (67).

2.2.2.5. EDTA-Behandlung von Zellen

Nach Ernten der Zellen werden diese 2 x in 200 ml 120 mM Tris/HCl pH 8.0 gewaschen. Je 1 000 OD-Einheiten werden in 40 ml 120 mM Tris/HCl pH 8.0 resuspendiert und bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Unter leichtem Schütteln erfolgt Zugabe von 80 µl 0.5 M Na_2EDTA pH 7.5 und weitere Inkubation für 2 min bei 37°C. Die so behandelten Zellen werden in 400 ml 50 mM

KP_i pH 6.0, 2 mM $MgSO_4$ verdünnt, abzentrifugiert und einmal in 40 ml des gleichen Puffers gewaschen und resuspendiert. Die Zellen werden bei RT aufbewahrt.

2.2.2.6. Bestimmung der ß-Galactosidase-Aktivität (35) (58)

Das Genprodukt des Z-Gens, die ß-Galactosidase (E.C. 3.2.1.23), hydrolysiert ß-Galaktoside.

ß-Galactosidase läßt sich mit Substraten, die nach der Hydrolyse farbige Produkte ergeben, leicht bestimmen. Ein solches Substrat ist o-Nitrophenyl-ß-D-galactosid (NpßGal), das in Galactose und o-Nitrophenol hydrolysiert wird. Das gelbe o-Nitrophenol läßt sich bei 420 nm photometrisch bestimmen. Bei sättigenden (NpßGal) Konzentrationen ist die Menge an o-Nitrophenol propertional zur vorhandenen Menge an Enzym.

Zur Bestimmung werden 0.1 ml Zellen bekannter optischer Dichte ($OD_{420\ nm}$ zwischen 10 und 20) auf 1 ml mit CR-Medium verdünnt. Durch Zugabe von 30 µl Toluol und 50 µl 0.1 % Na-desoxycholat werden die Zellen für kleine Moleküle wie NpßGal durchlässiger. Durch Schütteln bei 37°C für 1 h dampft man das Toluol ab und die Zellen stehen für die Aktivitätsbestimmung zur Verfügung. Je nach der zu erwartenden Aktivität pipettiert man 10 µl (oder mehr) der Zellen in Reagenzgläser, die 1 ml des 1 : 2 verdünnten ß-Galactosidase-Puffers enthalten. Die Reaktion wird durch 50 µl NpßGal (Endkonzentration 2 mM) gestartet (Inkubation bei 28°C im Wasserbad). Nach geeigneten Zeiten stoppt man die Reaktion durch 0.5 ml 1 M Na_2CO_3, welches den pH nach 11 verschiebt und damit das Enzym inaktiviert. Gemessen wird dann die Absorption bei 420 nm im Gilford Microsample Spectrophotometer.

Die Berechnung der spezifischen Aktivität SA in µmol Substrat/min^{-1} mg $Zellprotein^{-1}$ erfolgt mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 3 (42).

Durch die Beziehung

$$\frac{\text{OD (Ernte)} \times \text{SA}}{\text{OD (Ernte)} - \text{OD (Induktion)}}$$

läßt sich die Aktivität auf neusynthetisiertes Protein umrechnen.

2.2.2.7. in vivo-NpßGal-Hydrolyse (35)

Bakterien, die ein funktionelles Y-Gen besitzen, sind in der Lage, NpßGal als Substrat zu binden und über die Membran ins Cytoplasma zu transportieren. In Zellen, die neben intaktem Y-Genprodukt auch intaktes Z-Genprodukt exprimieren, wird das über die Permease aufgenommene NpßGal durch ß-Galactosidase in Galactose und o-Nitrophenol gespalten. Da letzteres farbig ist, läßt es sich photometrisch bestimmen, so daß die Menge an o-Nitrophenol ein Maß für die Transportaktivität der Permease ist, da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Transport von NpßGal über die cytoplasmatische Membran ist. Die Bestimmung erfolgt in einem Aminco-Doppelwellenlängen-Photometer bei 420 nm. In zwei 1 ml Küvetten wird einer Zellsuspension (Zell-OD zwischen 10 und 20) in CR-Medium NpßGal als Substrat angeboten. Nach einiger Zeit pipettiert man in die Referenzküvette GalSGal (Endkonzentration 2 mM), in die andere Küvette das entsprechende Volumen an H_2O. Wegen der höheren Affinität von GalSGal zu den Bindungsstellen im Vergleich zu NpßGal ($k_T^{GalSGal}$ = 50 µM, $k_T^{NpßGal}$ = 1 mM) werden die Bindungsstellen durch GalSGal abgesättigt, so daß NpßGal nur noch passiv mittels Diffusion in die Zellen gelangt. Da das Photometer die Extinktion der Referenzküvette (unspezifische Diffusion) von der Extinktion der Meßküvette (Permease-abhängiger Transport und unspezifische Diffusion) abzieht, stellt die Extinktionszunahme den Permease-spezifischen Transport von NpßGal dar.

Die spezifische Aktivität (µmol Substrat min^{-1} mg Zellprotein^{-1}) wird mit einem molaren Extinktionskoeffizient von 2.1 (6) berechnet.

2.2.2.8. Bestimmung der Anzahl an Permeasemolekülen durch Flußdialyse

Durch Verwendung radioaktiv markierter Substrate der Lactose-Permease kann mit Hilfe der Flußdialyse durch Gleichgewichtsbindung in Zellen oder Membranvesikeln der Carriergehalt bestimmt werden.

Bei der Flußdialyse benützt man eine Dialysezelle, die aus einem oberen und unteren Kompartiment besteht. Eine Dialysemembran, die nur für kleine Moleküle permeabel ist, trennt beide Kompartimente (10). Gibt man in die obere Kammer, die Reaktionskammer, Membranen und Substrat, und pumpt gleichzeitig Puffer durch die untere Kammer, so kann man das freie, nicht gebundene Substrat, welches über Diffusion in die untere Kammer gelangt, fraktionsweise sammeln. Die Konzentration an Substrat im Eluat der unteren Kammer ist proportional zur freien Substratkonzentration in der Reaktionskammer. Durch Zugabe eines Überschusses an nichtmarkiertem Substrat oder Hg-Verbindungen verdrängt man das gebundene Substrat und erhöht damit die Konzentration an freiem, markierten Substrat. Diese Erhöhung ist ein Maß für die Anzahl der Permeasemoleküle in der Probe.

In einem typischen Flußdialyse-Experiment werden in die obere Kammer 0.5 ml einer Probe (Membransuspension oder Zellen) in KP_i-Puffer (incl. NaN_3 10 mM) pipettiert und mittels eines kleinen Magnetrührers gerührt. Gleichzeitig pumpt man KP_i-Puffer durch die untere Kammer (1 ml/min). Durch Zugabe von radioaktivem Substrat wie z. B. [6-^{3}H]NpαGal wird die Reaktion gestartet. Man fraktioniert (1.1 ml/Fraktion) bis zur Gleichgewichtseinstellung (ca. 5 min oder 5-10 Fraktionen). Mit

$ClHgBzSO_3$ (10 µl einer 20 mM Stammlösung) setzt man das gebundene Substrat frei und fraktioniert weiter für 5-10 Faktionen. 1 ml Aliquots der Fraktionen werden dann mit 5 ml Scintillationsflüssigkeit gemischt und im Scintillationszähler gezählt. Die cpm pro Fraktion werden in einem geeigneten Diagramm aufgetragen und ausgewertet (67).

2.2.2.9. Aktiver Transport in Zellen

Nach Resuspendieren der Zellen in KP_i-Puffer werden diese auf einen OD von 12 verdünnt und mit Glyzerin (Endkonzentration 0.25 %) und $MgSO_4$ (Endkonzentration 2 mM) versetzt.

Die Transportmessung erfolgt bei RT durch Zugabe von 50 µl Substrat zu 450 µl Zellen. Durch 5 ml Stoppuffer (KP_i 50 mM pH 6.3, $HgCl_2$ 2 mM) wird die Aufnahme von Substrat nach geeigneten Zeiten gestoppt und die Zellen werden abfiltriert (Glasfiberfilter, Schleicher und Schüll). Nach dreimaligem Waschen der Filter mit Stoppuffer überführt man die Filter in Scintillationsfläschchen, setzt 5 ml Scintillator zu, schüttelt für 20 min und zählt anschließend.

Transportmessungen, bei denen die Aufnahme des markierten Substrats durch Zusatz eines zweiten, nicht markierten Substrats gehemmt werden soll (bedingt durch die höhere Affinität oder die höhere Konzentration des zweiten Substrats) werden 400 µl Zellsuspension mit 50 µl Hemmsubstrat versetzt und dann mit markiertem Substrat inkubiert. Als Kontrolle (nicht gehemmte Aufnahme) versetzt man die Zellen mit dem entsprechenden Volumen an KP_i 50 mM pH 6.3 und inkubiert dann mit markiertem Substrat.

2.2.2.10. Efflux-Bestimmung

Nach Verdünnen der Zellen auf einen OD von 12 werden diese durch CCCP (Endkonzentration 0.01 mM) und NaN_3 (Endkonzentra-

tion 10 mM) vergiftet. Man läßt die Zellen 20 min bei RT stehen, sedimentiert sie dann durch Zentrifugation und nimmt sie mit dem Überstand zu 450 µl bzw. 900 µl auf. Durch Zugabe von 50 µl bzw. 100 µl Substrat belädt man die Zellen über Nacht bei 0°C.

Die Kinetik des Effluxes wird bestimmt durch Verdünnen von 20 µl beladener Zellen in 4 ml KP_i 50 mM pH 6.3 und Abstoppen des Auswärtsstromes von Substrat durch 5 ml Stoppuffer (KP_i 50 mM pH 6.3, $HgCl_2$ 2 mM) zu verschiedenen Zeiten. Die Zellen werden abfiltriert, die Filter dreimal mit 5 ml Stoppuffer gewaschen und nach Zugabe von Scintillationsflüssigkeit im Scintillator gezählt. Um die Gleichgewichtskonzentration an Substrat, die in den Zellen bleibt, zu bestimmen, verdünnt man 20 µl Zellen in 3.8 ml KP_i 50 mM pH 6.3, gibt 200 µl Na-desoxycholat (Endkonzentration 0.005 %) und 20 µl Toluol hinzu, schüttelt für 1-2 h bei RT und filtriert dann die Zellen ab.

2.2.2.11. Isolierung von Plasmid-DNA über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation (13)

Eine ÜK des Plasmidstammes wird 1 : 100 in NBA-Medium verdünnt und bis zu einem OD von 0.5-0.8 angezogen.

Durch Zugabe von Chloramphenicol (Endkonzentration 200 µg/ml, in Methanol gelöst) läßt sich pBR 322 und seine Derivate amplifizieren (11) (57), ebenso das pACYC 184-Derivat pGM 21, während pACYC 184 durch Spectinomycin (Endkonzentration 300 µg/ml, in Äthanol gelöst) amplifizierbar ist (7).

Die Amplifikation erfolgt für 12-16 h. Nach Ernten der Zellen (10 min bei 10 000 Upm, 4°C, GSA-Rotor, Sorvall) werden diese in 8 ml 25 % (w/v) Sucrose, 50 mM Tris/HCl pH 7.8 resuspendiert (Volumenangabe bezieht sich auf 1 l amplifizierte Kultur) und auf Eis gestellt. Es folgt Zugabe von 1.6 ml Lysozym (10 mg/ml in 25 mM Tris/HCl pH 7.8) und nach Inkubation

für 5 min auf Eis Zugabe von 1.6 ml 250 mM Na_2EDTA pH 7.8. Nach 15 min auf Eis werden die Zellen durch 6.4 ml Lysis-Mix (2 % Triton-X-100, 60 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 7.8) bei 37°C im Wasserbad für 20 min lysiert. Das klare Lysat wird zentrifugiert (30 min bei 20 000 Upm, 4°C, SS 34-Rotor, Sorvall) und das Volumen des Überstandes bestimmt. Pro 4 ml Lysatüberstand wiegt man 4.1 g CsCl ein, versetzt mit 0.5 ml einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml Stammlösung) und zentrifugiert im Vertikalrotor TV 865 (Du Pont) für 6-8 h bei 55 000 Upm und 15°C. Anschließend wird der Gradient unter UV-Licht betrachtet, wobei zwei Banden sichtbar sind: eine obere chromosomale Bande und eine untere, Plasmid-DNA enthaltende Bande. Durch seitliches Anstechen mit einer Kanüle wird die Plasmid-Bande abgezogen und wird, falls nötig, über einen zweiten CsCl-Gradienten gereinigt. Durch mehrmalige Extraktion mit CsCl-gesättigtem Isopropanol entfernt man das Ethidiumbromid. Nach Dialyse gegen 1 x TE-Puffer (mehrmals den Puffer wechseln) wird die DNA mit Äthanol gefällt, im Vakuum getrocknet, in H_2O aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.12. Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Plasmide mit hoher Kopienzahl lassen sich nach der Methode von Horowicz et al. leicht isolieren (18).

1 ml Zellen einer ÜK in NBA-Medium werden abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge), in 100 µl 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 8.0 resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl 0.2-N-NaOH, 1 % SDS (nur 1 Woche haltbar) auf Eis gestellt. Durch vorsichtiges Untermischen von 150 µl kaltem 5 M K-Acetat pH 4.8 fällt man Proteine und chromosomale DNA. Nach 5 min auf Eis zentrifugiert man (1 min). Den Überstand nimmt man vorsichtig ab, fällt mit dem doppelten Volumen an kaltem Äthanol, wäscht einmal mit Äthanol, trocknet im Exsikkator und nimmt die DNA in 50 µl H_2O auf.

Die mitisolierte RNA läßt sich durch eine RNase-Verdauung entfernen. Dazu kocht man eine RNase-Stammlösung (1 mg/ml) für 20 min im Wasserbad, um die als Verunreinigung vorhandene DNase zu inaktivieren, läßt dann die RNase-Lösung (in H_2O) langsam abkühlen und setzt die so behandelte RNase in einer Endkonzentration von 20 µg/µl ein (2 min bei 37°C). Inaktivierung der RNase erfolgt durch Phenolextraktion mit anschließender Ätherbehandlung und Äthanolfällung der DNA.

2.2.2.13. DNA-Mengenbestimmung

Die quantitative Bestimmung gereinigter DNA erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Einer Extinktion von $E_{260\ nm} = 1$ entspricht dabei einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml (gilt für doppelsträngige DNA). Aus dem Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm kann man die Reinheit der DNA-Probe abschätzen. Reine DNA-Präparationen haben ein E_{260}/E_{280}-Verhältnis von 1.8-2, während Verunreinigungen wie Proteine das Verhältnis herabsetzen (24).

2.2.2.14. DNA-Präzipitation

DNA läßt sich mit dem zwei- bis dreifachen Volumen Äthanol aus einer 0.3 M Na-Acetat, 0.01 M Mg-Acetat-Lösung fällen. Nach Inkubation des Gemisches für 30 min bei -70°C wird 15 min in einer Eppendorf-Zentrifuge die gefällte DNA abzentrifugiert, in 1 ml Äthanol gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in H_2O aufgenommen.

2.2.2.15. Phenol-Extraktion

Der DNA-Lösung wird dasselbe Volumen puffergesättigtes Phenol zugegeben (Phenol in 1 M Tris/HCl pH 8.0). Nach gründ-

lichem Mischen wird für 1 min in der Eppendorfzentrifuge zur Phasentrennung zentrifugiert. Die wässrige obere DNA-Phase wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mehrmals mit Diethyläther zum Entfernen von Spuren von Phenol extrahiert und mit Äthanol gefällt.

2.2.2.16. Spalten von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Verdauung von DNA mit Restriktionsenzymen wird in den für die einzelnen Enzyme vorgesehenen Restriktionspuffern durchgeführt. Als Grundpuffer wird EB- bzw. EBS-Puffer verwendet; eventuell notwendige Zusätze wie BSA oder Salze werden nachträglich zugegeben (Tabelle 1). 1 µg Plasmid-DNA wird mit 2 Einheiten Enzym (Definition von Enzymeinheit entsprechend den Angaben des Herstellers) für 1 h bei 37°C verdaut. Durch Erhitzen auf 70°C für 10 min werden die Enzyme inaktiviert. Bei präparativen Verdauungen größerer DNA-Mengen wird mit 1/10 Enzymeinheit pro µg DNA über Nacht verdaut.

10 x EB-Puffer : 100 mM Tris/HCl pH 7.5
60 mM $MgCl_2$
10 mM DTT

10 x EBS-Puffer : 10 x EB-Puffer + 500 mM NaCl

Enzym	Puffer	BSA 100 µg/ml	1 M NaCl 1 µl/10 µl	KCl mM	1 M Tris pH 7.5 1 µl/10 µl	50 mM Tris-base 1 µl/10 µl
Acc I	EBS					
Alu I	EBS					
Ava I	EBS					
Bam HI	EBS		+			
Cla I	EB					
Eco RI	EBS				+	
Pvu II	EBS	+				
Sma I	EB			20		+

Tabelle 1: Restriktionsenzyme und ihre Puffer

2.2.2.17. Ligierung von DNA

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten erfolgt mit T_4-DNA-Ligase (Boehringer) mit einem molaren Mengenverhältnis von ungefähr 1 : 1 in 1 x Ligase-Puffer (10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 mM Tris/HCl pH 7.6) über Nacht bei 12°C. Bei Ligationen von DNA-Fragmenten mit "stumpfen" Enden (blunt end ligation) erhöht man die ATP-Konzentration auf 2 mM.

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in die replikative DNA-Form des Phagen M13 mp8 bzw. mp9 (26) wird bei "sticky-end"-Ligierungen die einzuligierende DNA in drei- bis fünffachem Überschuß zu 20 ng Vektor-DNA gegeben. Bei "blunt-end"-Ligierungen erhöht man die Phagen-DNA-Menge auf einen bis zu 30fachen Überschuß.

2.2.2.18. Agarose-Gelelektrophorese

Für analytische und präparative Gele wird Agarose Standard Low M_r der Firma Bio Rad, Richmond, Californien verwendet.

Eine Plexiglasplatte (12.5 cm x 12.5 cm x 1 cm) wird mit Tesaband umklebt, so daß ein etwa 1 cm hoher Rand gebildet wird. In diese Kammer werden 100 ml in Tris-Acetat-Elektrophorese-Puffer gekochte und auf 60°C abgekühlte Agarose gegossen. Zur Bildung von Taschen, in die man die Proben einfüllt, wird 1-3 mm über die Gelplatte ein Probenkamm eingehängt (Fassungsvermögen der Geltaschen ca. 50 µl). Die DNA-Proben werden mit DNA-Auftragspuffer (5 % Glycerin, 0.01 (w/v) Bromphenolblau, 0.01 % (w/v) Xylencyanol) gemischt (1/10 Volumen) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Elektrophorese erfolgt in horizontaler Richtung in einer Gelkammer mit 2.5 l 1 x Elektrophorese-Puffer bei 100 Volt konstanter Spannung.

Die Agarose-Konzentration richtet sich dabei nach der Größe der zu trennenden Fragmente (24).

Neben diesem Gelsystem hat das Mini-Gel-System der Firma BRL (Baby Gel, Model H6, BRL, Inc., Gaithersburg) den Vorteil, daß neben einer Verkürzung der Elektrophoresedauer auch bedeutend weniger DNA aufgetragen werden kann.

2.2.2.19. DNA-Längenstandard

Zur Bestimmung der Größe von Restriktionsfragmenten auf Agarose-Gelen dient als Längenstandard ein Pvu II- und Eco RI-Restriktionsverdau des Plasmids pKN 410. Die Größe der pKN 410-Fragmente beträgt (in Kb):

15.5
6
2.9
2.09
1.65
1.32
0.75
0.52
0.25

2.2.2.20. Ethidiumbromid-Färbung

Die durch Agarose-Gelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente lassen sich durch Anfärben mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar machen.

Dazu wird das Gel für 15 min in eine Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) gelegt, danach 10 min gewässert und unter UV-Licht photographiert (Polaroid MP 3 mit Polaroidfilm PN 55).

2.2.2.21. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach Trennung von DNA-Fragmenten auf Agarose-Gelen wird ein Randstreifen des Gels mit Ethidiumbromid gefärbt, um das gewünschte Fragment zu lokalisieren. Aus dem ungefärbten Rest des Gels schneidet man das gewünschte Fragment mit einem Skalpell heraus, überführt das Agarose-Gelstück in einen Dialyseschlauch (Ausschlußvolumen 12 000-14 000 MW) und füllt mit 5-10 ml 1 x Elektrophorese-Puffer auf. Der Dialyseschlauch wird in eine mit Elektrophorese-Puffer gefüllte Gelkammer senkrecht zum Stromfluß gelegt. Die Elution erfolgt für 2 h bei 120 Volt oder über Nacht bei 30 Volt. Wichtig vor Abbruch der Elektroelution ist eine Umpolung der Stromrichtung für 2 min, um die DNA von der Dialyseschlauchwand zu lösen.

Das eluierte DNA-Fragment läßt sich anschließend über Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Cellulose reinigen.

Dialyseschläuche werden vor ihrer Verwendung gekocht (1 x für 20 min in 10 mM $NaHCO_3$, 1 x für 20 min in 20 mM Na_2EDTA, 1 x in H_2O) und in 1 x TE-Puffer bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.22. DEAE-Cellulose-Säule

DEAE-Cellulose ist ein Anionenaustauscher, der zur Reinigung von aus Agarose-Gelen isolierter DNA verwendet werden kann. Als Säule dient eine Pasteur-Pipette, die mit einem Whatman Glasfiberfilter GF/L abgedichtet und mit ca. 2 cm Säulenmaterial (DEAE-Cellulose in 1 x TE-Puffer) gefüllt ist. Vor Beladen der Säule mit DNA wird diese mit dem dreifachen Säulenvolumen gewaschen (1 x TE-Puffer). Nach Auftragen der Probe wird die Säule mit 1 x TE-Puffer + 0.15 M NaCl gewaschen (dreifaches Säulenvolumen). Die Elution der DNA erfolgt bei hoher Salzkonzentration mit 4 x 0.5 ml 1 x TE-Puffer + 1 M NaCl. Das Eluat wird zur Fällung der DNA mit 0.3 ml 3 M Na-Acetat, 0.3 ml 0.1 M Mg-Acetat, 0.4 ml 1 x TE-Puffer

und 9 ml Äthanol versetzt und über Nacht bei -50°C stehen belassen. Nach Zentrifugation (30 min bei 10 000 Upm, 4°C, SS 34-Rotor, Sorvall) wird mit Äthanol gewaschen, im Exsikkator getrocknet und die DNA in 100 µl H_2O gelöst.

2.2.2.23. Isolierung von rekombinanter M13-Phagen-DNA für die DNA-Sequenzierung nach Sanger (Template-Isolierung) (modifiziert nach (51))

Nach Vermehrung der rekombinanten M13-Phagen-DNA (s. 2.2.1.10.) wird 1 ml der Kultur abzentrifugiert (Eppendorfzentrifuge). Man nimmt vorsichtig 800 µl Überstand, der die rekombinante Phagen-DNA enthält, ab und fällt die DNA durch Zugabe von 200 µl eines Gemisches von 2.5 M NaCl und 20 % Polyäthylenglykol 6 000 (NaCl/PEG-Gemisch immer frisch aus entsprechenden Stammlösungen ansetzen). Nach 15 min bei RT wird die gefällte DNA abzentrifugiert (5 min) und der Überstand mit einer Pasteur-Pipette abgezogen. Durch erneute Zentrifugation werden restliche Spuren von PEG entfernt. Das DNA-Sediment wird in 200 µl 1 x TE-Puffer gelöst und mit 150 µl Phenol gemischt. Nach kurzer Zentrifugation zur besseren Phasentrennung nimmt man 150 µl der oberen Phase ab und fällt durch Zugabe von 40 µl 5 M $NaClO_4$ und 100 µl Isopropanol. Man zentrifugiert für 15 min, resuspendiert den Niederschlag in 300 µl 0.3 M Na-Acetat und setzt 800 µl Äthanol zu. Durch erneute Zentrifugation (15 min) pelletiert man die Phagen-DNA, wäscht mit 300 µl Äthanol, trocknet und nimmt die Phagen-DNA in 30 µl H_2O auf.

2.2.2.24. Hybridisierung von Primer- und Template-DNA (Annealing)

Die isolierte rekombinante einzelsträngige Phagen-DNA dient bei der DNA-Sequenzierung nach Sanger als Matrize für die Neusynthese des komplementären DNA-Strangs. Als Startstelle

für die Polymerase I (Klenow-Fragment (23)) wird ein synthetischer Primer von 15 Bp komplementär zum 3'-Ende neben der Klonierungsstelle angelagert. Die Hybridisierung erfolgt in 10 µl Gesamtvolumen mit 1 µl Primer (2.5 ng, Biolabs), 8 µl Template-DNA und 1 µl 10 x Hin 100 (100 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris/HCl pH 7.8) durch Inkubation für 10 min bei 70°C im Wasserbad und anschließendem langsamen Abkühlen auf RT.

2.2.2.25. DNA-Sequenzierung nach Sanger (50)

Die Sequenzierung von DNA nach der Methode von Sanger beruht auf dem Prinzip des Kettenabbruchs einer wachsenden Polynukleotidkette durch Didesoxynukleotide. Da diesen die 3'-Hydroxylgruppe fehlt, ist eine Verknüpfung mit dem folgenden Nukleotid nicht möglich und die Nukleotidkette bricht ab.

Für die vier Sequenzreaktionen, die spezifisch für die vier Nukleotide sind, werden je 2 µl des Template-Primer-Mix auf 4 Eppendorfgefäße verteilt. Dazu gibt man 2 µl Nukleotid-Mix, jeweils spezifisch für Guanin (G-Mix), Adenin (A-Mix), Cytosin (C-Mix) und Thymin (T-Mix). Durch Zugabe von 2 µl "Go-Mix" wird die Reaktion gestartet. Nach 15 min bei RT werden 2 µl Chase-Mix zugegeben und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt durch Stop-Mix (2-6 µl). Vor Auftragen der Proben auf das Gel werden die Proben in einer heizbaren Vakuumzentrifuge eingedampft und anschließend zur Denaturierung für 1 min im Wasserbad gekocht.

2.2.2.26. DNA-Sequenzgele

Die Auftrennung von DNA-Molekülen nach der DNA-Sequenzierung nach Sanger erfolgt über 6 % Acrylamidgele, die zur DNA-Denaturierung 8 M Harnstoff enthalten. Die Gelgröße beträgt

40 cm x 20 cm x 0.5 mm. Zum Entsalzen läßt man die Gele zunächst für ca. 1 h bei 40 Watt laufen. Elektrophorese-Puffer ist 1 x TBE-Puffer.

2.2.2.27. Autoradiographie

Radioaktiv markierte DNA, die über Polyacrylamidgele getrennt wird, läßt sich durch Autoradiographie als Schwärzung auf einem Röntgenfilm sichtbar machen. Nach Abtrennung einer Gelplatte wird die Geloberfläche mit Frapanfolie abgedichtet, ein Röntgenfilm aufgelegt, mit einer Glasplatte beschwert, lichtdicht in Alufolie eingepackt und bei -20°C exponiert. Die Exposition erfolgt über Nacht oder länger.

3. Ergebnisse

3.1. Isolation der Mutante lacY^{59}

Ausgehend von dem Wildtypplasmid pTE 18 (59) wurde das Plasmid pTE 18/59 folgendermaßen isoliert (P. Overath, persönliche Mitteilung):

Die Mutagenese von pTE 18 mit Hydroxylamin (NH_2OH) wurde nach Humphreys et al. durchgeführt (19).

Dazu wurden 10 µg Plasmid-DNA in 0.1 M Na_2HPO_4, pH 6.0, 1 mM Na_2EDTA mit NH_2OH zu einer Endkonzentration von 0.4 M NH_2OH versetzt. Nach Inkubation für 15 min bei 0°C wurde 30 min bei 70°C inkubiert und anschließend 10 min bei 0°C. Die mutagenisierte DNA wurde über Nacht gegen 1 x TE-Puffer dialysiert und damit anschließend der Stamm T28RT transformiert (Plattierung der Transformanten auf NBA-Tet-Platten). Zur Identifizierung von Lac^--Mutanten wurden die Kolonien auf Minimal-Lactose-Tet-Platten gestempelt. Nach Reinigung der Lac^--Klone wurden diese auf ihre Bindungs- (Np∝Gal-Bindung) und Transportaktivität (NpßGal-Hydrolyse) untersucht.

Eine Mutante (Nummer 59) zeigte dabei wie der entsprechende Wildtypstamm T52RT Np∝Gal-Bindung, jedoch keinen meßbaren NpßGal-Transport. Ferner zeigte die Mutante kein Wachstum auf Minimal-Lactose-Platten bei hoher (14 mM) und niedriger (1.4 mM) Lactose-Konzentration oder auf Minimal-Melibiose-Platten bei 42°C. Auf EMB-Lactose-Platten wurde von der Mutante ein Lac^--Phänotyp ausgeprägt.

Diese Eigenschaften führten zu dem vorläufigen Schluß, daß der mutierte Lactose-Träger der Mutante Nr. 59 zwar noch Substrat bindet, jedoch in der Translokation defekt ist.

Das Plasmid der Mutante Nr. 59 wurde pTE 18/59 genannt. Durch Klonieren des Eco RI-Fragments von pTE 18/59 in die Eco RI-

Schnittstelle des Vektors pACYC 184 (7) wurde das Plasmid pGM 21/59 erhalten. Da durch dieses Plasmid der charakteristische Y^{59}-Phänotyp exprimiert wurde, war sichergestellt, daß der Y^{59}-Phänotyp Vektor-unabhängig ist.

Die Orientierung des Eco RI-Fragments sowohl in pTE 18/59 als auch in pGM 21/59 ist gleich der in den entsprechenden Wildtypplasmiden; die Orientierung ist also analog zur Orientierung des lac-Operons auf dem E.coli-Chromosom. (Abb. 5).

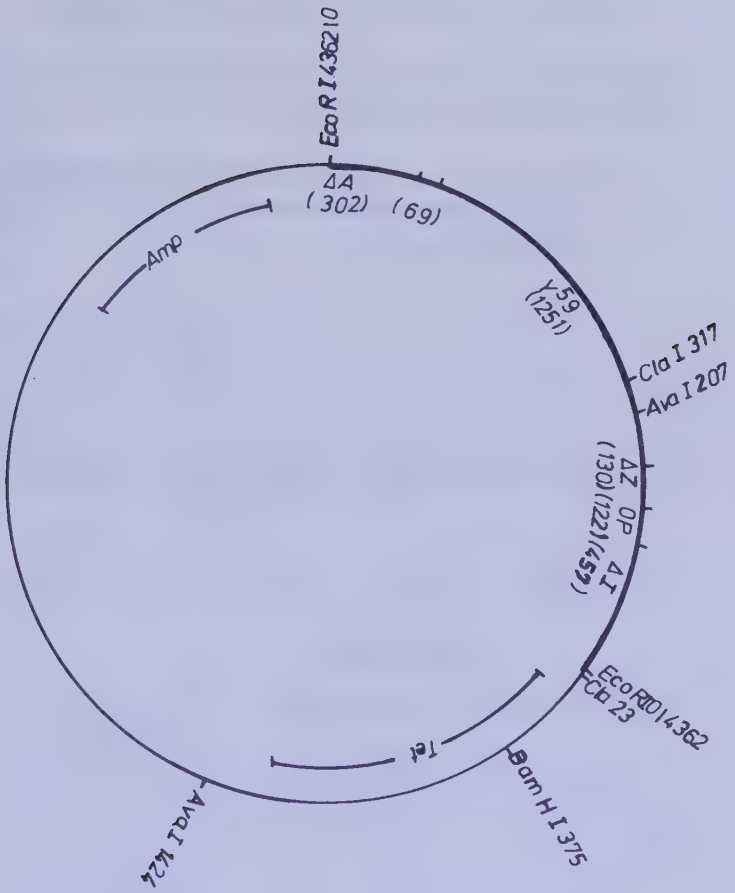


Abb. 5: Restriktionskarte von pTE 18/59
Die Gesamtgröße des Plasmids beträgt 6693 Bp, wovon 2331 Bp auf das Eco RI-Fragment entfallen, während der Vektor pBR 322 4362 Bp umfaßt. Zahlen in ( ) geben die Größe der lac-Operon-Gene auf dem Eco RI-Fragment an (in Bp). Schnittstellen für die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind angegeben (in Bp).

3.2. Kinetische Charakterisierung der Y^{59}-Mutante

3.2.1. Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D für Lactose, GalSGal und Np∝Gal

Die Galactosidbindung an den mutierten Lactose-Träger wurde in cytoplasmatischen Membranvesikeln des Stammes T213 mit Hilfe der Flußdialyse bestimmt.

Als Substrat wurden Lactose (natürliches Substrat der Lactose-Permease; $K_D \rightarrow K_T$-Effekt), GalSGal (ähnliche Struktur wie Lactose; kein $K_D \rightarrow K_T$-Effekt) und Np∝Gal (vollkommen andere Struktur wie Lactose und GalSGal; kein $K_D \rightarrow K_T$-Effekt; affinstes Substrat) verwendet. Ein typisches Flußdialyse-Experiment ist in Abb. 6 dargestellt (Bindung von Np∝Gal).

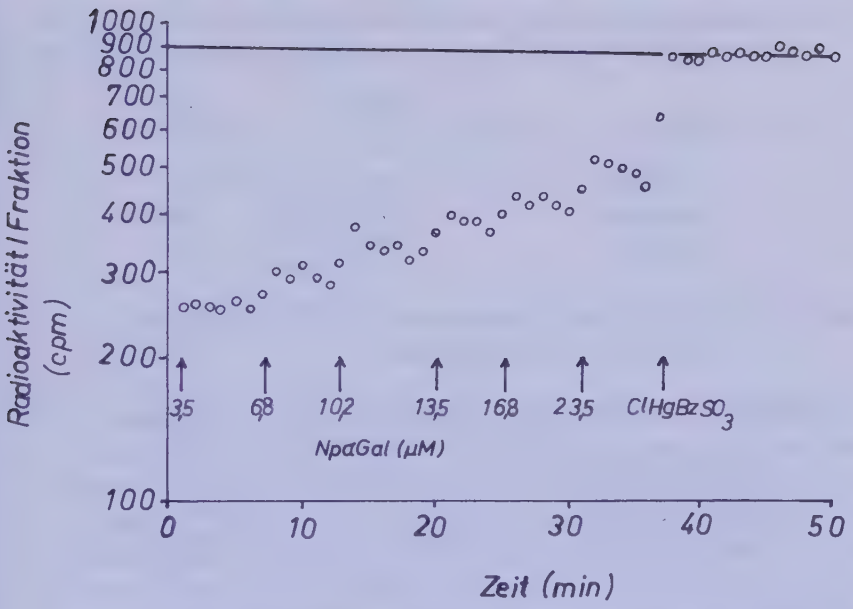


Abb. 6: NpαGal-Bindung an cytoplasmatische Membranvesikel vom Stamm T213.
Zur Bestimmung der K_D-Werte für Lactose, GalSGal und NpαGal wurden 2 ml einer Vesikelsuspension in 50 mM KP_i pH 6.3, 1 mM $MgSO_4$, 10 mM NaN_3 mit [6-^{3}H]NpαGal (40 kBq) versetzt (3.14 μM NpαGal) und jeweils 600 μl Membransuspension pro Bindungsversuch eingesetzt. Durch Zugabe von unmarkiertem Substrat (Lactose, GalSGal oder NpαGal) in steigenden Konzentrationen wurde das markierte NpαGal verdrängt. Es wurden je Konzentration 6 Fraktionen gesammelt. Durch $ClHgBzSO_3$ (0.4 mM) erfolgte vollständige Substratfreisetzung. Die K_D-Werte wurden wie in (65) beschrieben aus den Bindungsdiagrammen ermittelt.

Für die Y^{59}-Permease wurden folgende K_D-Werte bestimmt (Tabelle 2; Werte für Y^+ aus (65)):

Substrat	K_D	
	Y^{59}	Y^+
Lactose	625	14 000
GalSGal	40	53
Np∝Gal	4.6	22

Tabelle 2: K_D-Werte (µM) für Lactose, GalSGal und Np∝Gal für die Y^{59}-Lactose-Permease

Im Vergleich zum Wildtyp zeigt der mutierte Lactose-Träger eine deutlich höhere Affinität für Lactose (22 x höhere Affinität). Np∝Gal wird ebenfalls mit einer höheren Affinität von der mutierten Lactose-Permease gebunden, wobei die Affinitätserhöhung im Vergleich zum Wildtyp einen Faktor 5 beträgt. Die Affinität zu GalSGal ist dabei mit der Affinität des Wildtyps vergleichbar.

Wie für die Wildtyppermease, so ist auch für die Y^{59}-Lactose-Permease das affinste Substrat Np∝Gal. Es folgen GalSGal und Lactose.

3.2.2. Bestimmung der Zahl der Bindungsstellen in Y^+- und Y^{59}-Stämmen

Durch Flußdialyse wurde die Zahl der Bindungsstellen in Zellmembranpräparationen der Mutante im Vergleich zum Wildtyp bestimmt, da nicht auszuschließen ist, daß durch die Mutation das Y^{59}-Gen schlechter exprimiert wird.

Wie in Tabelle 3 dargestellt, ist die Zahl der Bindungsstellen in Zellmembranpräparationen von Stämmen, die das Mutanten-

plasmid enthalten, gleich der Anzahl an Bindungsstellen in Zellmembranpräparationen von Stämmen, die das Wildtypplasmid enthalten. Im Vergleich zu einem Stamm mit einer Y^+-Genkopie wird durch das Mutantenplasmid bzw. das Wildtypplasmid der Anteil an Lactose-Permease um einen Faktor 8.5 erhöht.

Stamm	Anzahl der Bindungsstellen
Y^+ (Chromosom oder F'-Faktor)	0.14
Y^+ (Plasmid)	1.21
Y^{59} (Plasmid)	1.20
Y^-	<0.05

Tab. 3: Anzahl der Bindungsstellen (nmol mg Zellmembranprotein^{-1}) in Y^+- und Y^{59}-Stämmen.
Verwendet wurden nach 2.2.2.3. präparierte Zellmembranen aus Stämmen mit einer Y^+-Genkopie (Stamm ML 308-225), aus Stämmen mit Wildtypplasmid (T217, T206) oder Mutantenplasmid (T219, T213). Als Kontrollen dienten die Y^--Stämme T215 und T184. Anzucht der Stämme erfolgte in T31RT-Medium. Die Bindung von NpαGal wurde bei ca. 1/2 K_D gemessen, d. h., Y^+-Stämme bei 10 µM [6-^{3}H] NpαGal, ebenso Y^--Stämme, und Y^{59}-Stämme bei 2.8 µM [6-^{3}H] NpαGal.

3.2.3. NpßGal-Transport in Zellen

Die Bestimmung der Transportaktivität der Y^{59}-Lactose-Permease wurde in Zellen des Stammes T219 mit NpßGal als Substrat bestimmt (s. 2.2.2.7.). Als Vergleich dienten die Stämme T217 und T215. Um eine Aussage über die Vollständigkeit der Induktion des Stammes T219 machen zu können, wurde zusätzlich für alle drei Stämme die ß-Galactosidase-Aktivität nach 2.2.2.6. bestimmt.

Stamm	NpßGal-Transport		ß-Galactosidase
		%	
T 215	<0.01	<0.4	13
T 217	2.7	100	15
T 219	<0.01	<0.4	12

Tab. 4: Transport von NpßGal in Zellen der Stämme T215, T217 und T219 (µmol min^{-1} mg $Zellprotein^{-1}$, Konzentrationsbereich 0.2-3.0 mM NpßGal); ß-Galactosidase-Aktivität in µmol min^{-1} mg $Zellprotein^{-1}$

Da die ß-Galactosidase-Aktivität in allen drei Stämmen gleich ist, kann man annehmen, daß auch die Stämme T215 und T219 in gleichem Ausmaß wie der Wildtyp T217 induziert sind. Beide Stämme zeigen dabei im Vergleich zum Wildtyp eine sehr geringe NpßGal-Transportaktivität. Innerhalb der Meßgenauigkeit dieser Methode läßt sich kein Unterschied in der Transportaktivität zwischen dem Hintergrundstamm T215 und der Y^{59}-Mutante T219 feststellen; die Y^{59}-Lactose-Permease katalysiert demnach keinen Transport von NpßGal.

3.2.4. Aktiver Transport von GalSGal

Da über die Hydrolyse von NpßGal innerhalb der Meßgenauigkeit dieser Methode keine Transportaktivität durch den mutierten Lactose-Träger festgestellt werden konnte, wurde die Kinetik der Aufnahme von [6,6'-$^3H_2$] GalSGal in Zellen des Stammes T219 bestimmt, weil durch die Verwendung von radioaktiv markierter Substrate eine höhere Meßgenauigkeit sowie eine höhere Empfindlichkeit erreicht werden kann.

Durch Np∝Gal oder durch Inkubation der Zellen für 1-2 h in Gegenwart von NEtMal vor Zugabe von Substrat wurde die GalSGal-Aufnahme gehemmt. Als Vergleich wurde die Aufnahme von GalSGal in Zellen der Stämme T215, T27UW, T217 und ML308-225 bestimmt. (Anzucht der Stämme in T31RT-Medium). In Abb. 7 und Abb. 8 sind die Kinetiken der Aufnahme von GalSGal dargestellt.

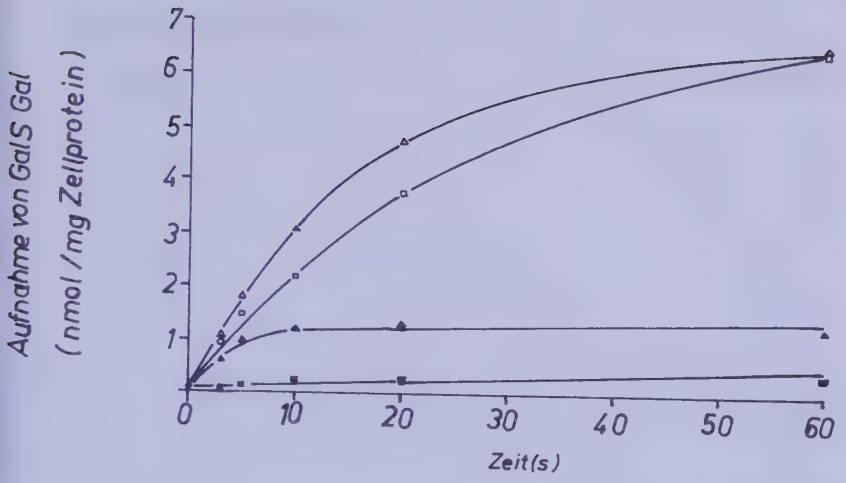


Abb. 7: Aktiver Transport von GalSGal (10 µM, 9.3 kBq [6,6'-$^{3}H_{2}$] GalSGal pro Probe) in Zellen der Stämme T217 (Δ - Δ) und ML308-225 (□ - □); Aufnahme in Gegenwart von Np∝Gal (500 µM): T217 (▲ - ▲), ML308-225 (■ - ■); GW: 0.05 nmol mg Zellprotein^{-1}

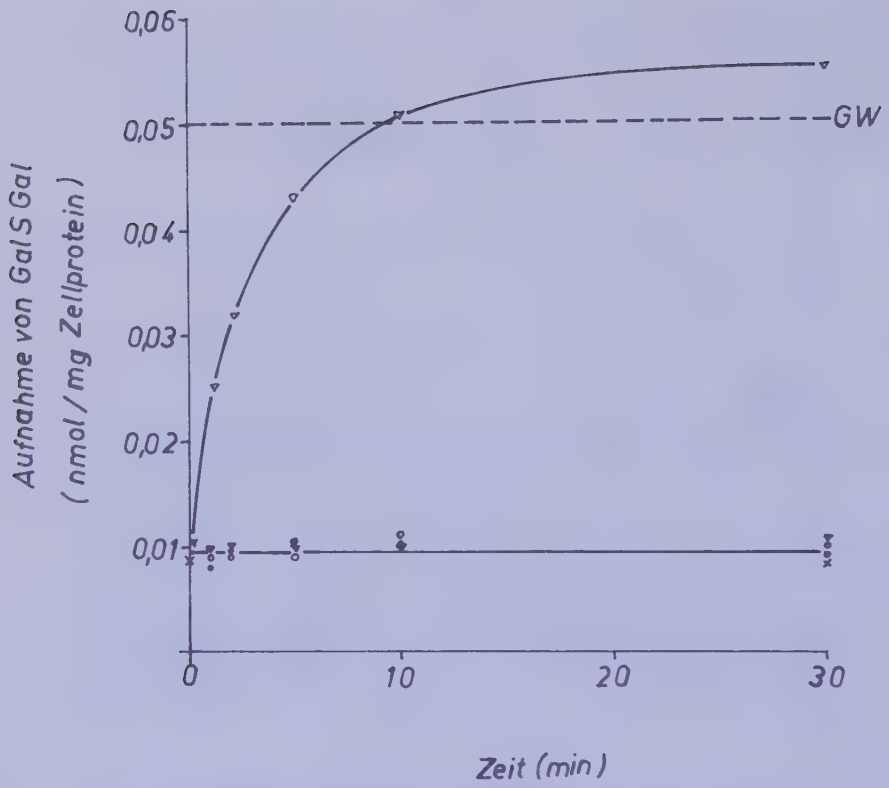


Abb. 8: Aktiver Transport von GalSGal (10 µM, 9.3 kBq [6,6'-$^3H_2$] GalSGal pro Probe) in Zellen der Stämme T219 (▽ - ▽) und T215 bzw. T27UW (o-o); Aufnahme in Gegenwart von Npα Gal (500 µM): T219 (▼ - ▼), T215 bzw. T27UW (●-●); Hemmung durch NEtMal (10 mM): (x-x) für alle Stämme

Es lassen sich für die Kinetik der GalSGal-Aufnahme folgende Anfangsgeschwindigkeiten v ermitteln (Tabelle 5):

Stamm	v -Np∝Gal	%	Akkumulation	v +Np∝Gal
ML308-225	17	100	127	1.3
T217	22	130	128	12
T219	0.008	0.05		
T215/ T27UW	<0.001			

Tab. 5: Anfangsgeschwindigkeit v (in nmol min^{-1} mg $Zellprotein^{-1}$) der GalSGal-Aufnahme in Zellen der Stämme ML308-225, T217, T219 und T215/T27UW ohne und mit Hemmung durch Np∝Gal

Wie aus Abb. 8 zu ersehen ist, zeigen die Stämme T215 und T27UW über den gemessenen Zeitbereich von 30 min keine Aufnahme von GalSGal. Im Stamm T219 findet dagegen Transport von GalSGal statt, allerdings nur bis zum Gleichgewicht, welches nach ca. 10 min erreicht wird. Diese Aufnahme von GalSGal wird durch die Y^{59}-Lactose-Permease vermittelt, da durch Np∝Gal, welches eine höhere Affinität zum Lactose-Träger besitzt als GalSGal, die Aufnahme von GalSGal vollständig gehemmt wird.

Die beiden Wildtypstämme T217 und ML308-225 zeigen wie erwartet aktiven Transport von GalSGal; schon nach 3 s wird das Gleichgewicht überschritten und Substrat akkumuliert. Die Anfangsgeschwindigkeit ist dabei in T217 nur geringfügig größer als in ML308-225. Durch Np∝Gal läßt sich die GalSGal-Aufnahme nicht vollständig hemmen, wohl aber durch NEtMal, welches die Substrataufnahme von GalSGal in Zellen der Stämme T219, T217 und ML308-225 vollständig hemmt.

Mit GalSGal läßt sich somit eine sehr geringe Transportaktivität der Y^{59}-Lactose-Permease nachweisen, die ca. 0.05 % der

Aktivität des Wildtypstammes ML308-225 beträgt und damit um einen Faktor 10 unter der mit NpßGal als Substrat bestimmten Aktivität liegt (s. 3.2.3.).

3.2.5. Bestimmung von V_{max}, K_T und k_{cat} mit GalSGal als Substrat

Den Transport von Substrat durch die Lactose-Permease über die Cytoplasmamembran kann man als einen mit der Enzymkatalyse vergleichbaren Vorgang betrachten. Demnach läßt sich durch Bestimmen der Maximalgeschwindigkeit V_{max} die Geschwindigkeitskonstante k_{cat} des katalytischen Umsatzes ermitteln (k_{cat} entspricht dem in der Enzymkinetik verwendeten Begriff der Wechselzahl). Die Menge an Permease, die zur Ermittlung von k_{cat} bekannt sein muß, wird mittels Flußdialyse (Npα Gal-Bindung) bestimmt.

Durch Messung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration läßt sich V_{max} und K_T, die für das Substrat charakteristische Transportkonstante, ermitteln (K_T entspricht der Michaelis-Menten-Konstante K_m von Enzymen).

k_{cat} läßt sich durch Normieren der Maximalgeschwindigkeit V_{max} auf die Zahl der Bindungsstellen berechnen, mit der Annahme, daß in der Zellmembranfraktion der Permease-Anteil 15 % des Proteingehalts der Zellmembranfraktion entspricht. Die Dimension von k_{cat} ist dabei s^{-1}.

Die Abb. 9 - 10 zeigen Lineweaver-Burk-Diagramme der Kinetik der Aufnahme von GalSGal in Zellen der Stämme T217, ML308-225 und T219, während in Abb. 11 die GalSGal-Aufnahme in Zellen vom Stamm T215 bei der höchsten verwendeten GalSGal-Konzentration dargestellt ist.

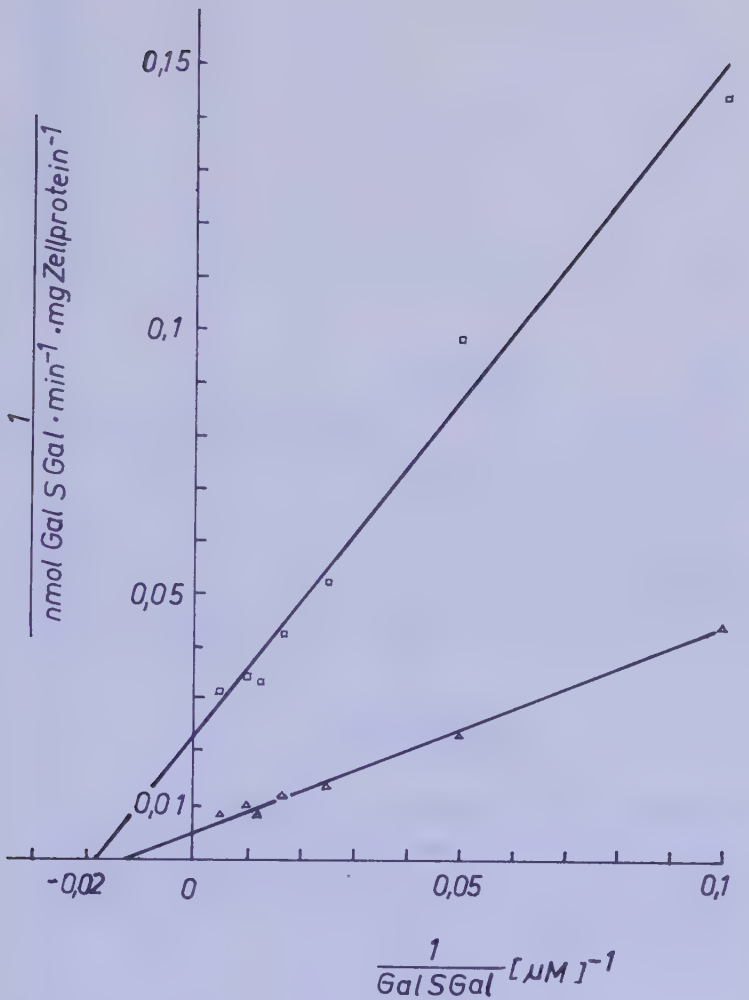


Abb. 9: Bestimmung von K_T (µM) und V_{max} (nmol min^{-1} mg Zellprotein^{-1}) in Zellen der Stämme T217 (Δ - Δ) und ML308-225 (□ - □) mit GalSGal als Substrat im Konzentrationsbereich von 10 µM - 200 µM (9.3 kBq [6,6'-$^3H_2$] GalSGal pro Probe); der Meßbereich umfaßte bis zu 20 s.

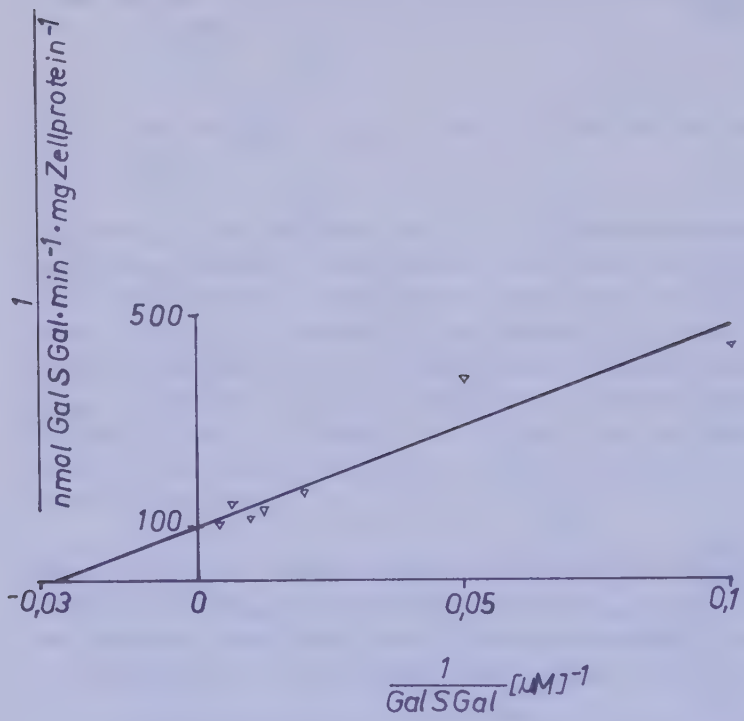


Abb. 10: Bestimmung von K_T (µM) und V_{max} (nmol min^{-1} mg Zellprotein^{-1}) in Zellen des Stammes T219 (▽ -▽) mit GalSGal als Substrat (Konzentrationsbereich 10 µM - 250 µM; 9.3 kBq[6,6'-$^3H_2$]GalSGal pro Probe); der Meßbereich umfaßte bis zu 10 min

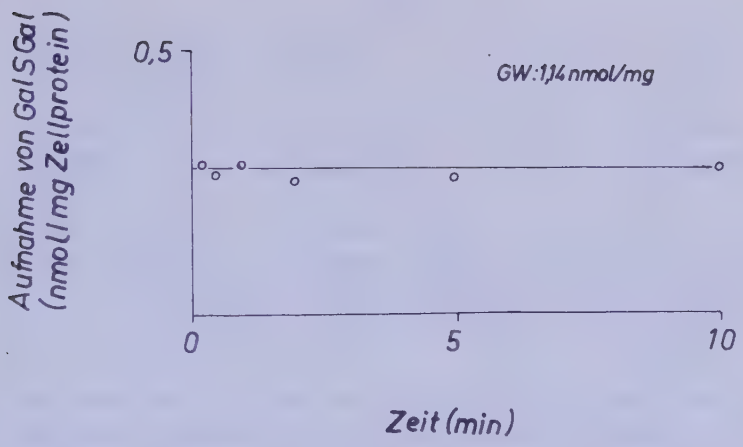


Abb. 11: Aufnahme von GalSGal (250 µM, 9.3 kBq [6,6'-$^3H_2$] GalSGal pro Probe) in Zellen des Stammes T215 (o-o);

Hemmung der Aufnahme von GalSGal erfolgte wie in 3.2.4. durch Np∝Gal (1 mM); in Abb. 12 ist die Kinetik der Aufnahme von GalSGal in Zellen der Stämme T217 und ML308-225 in Gegenwart von Np∝Gal dargestellt.

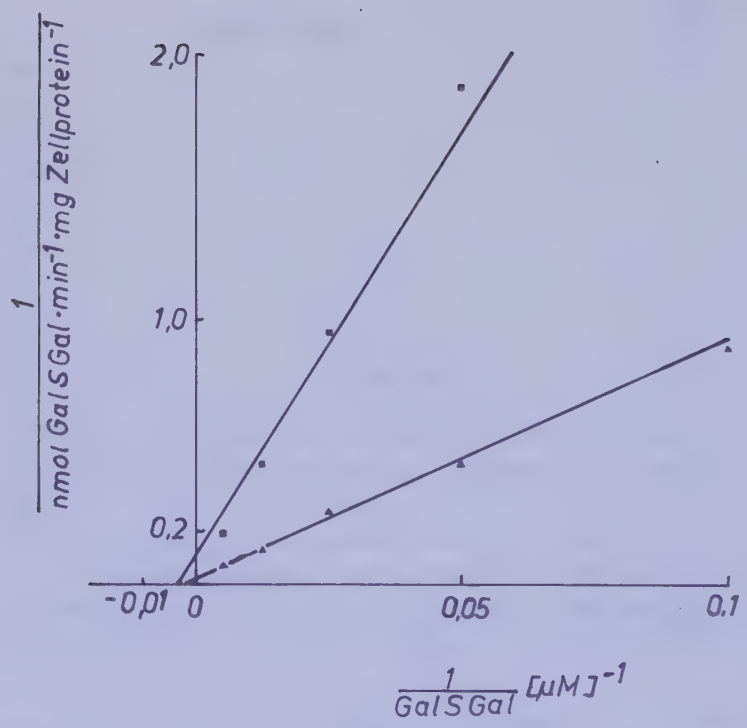


Abb. 12: Aufnahme von GalSGal in Zellen der Stämme T217 (▲ - ▲) und ML308-225 (■ - ■) in Gegenwart von Np∝Gal (1 mM); sonstige Bedingungen wie in Abb. 9

Aus den Abb. 9 - 11 lassen sich die in Tabelle 6 angegebenen Werte für K_T und V_{max} für die Aufnahme von GalSGal ermitteln, während in Tabelle 7 die aus Abb. 12 ermittelten K_T- und V_{max}-Werte in Gegenwart von Np∝Gal dargestellt sind.

Stamm	V_{max}	%	k_{cat}	K_T
ML308-225	64	100	44	68
T 217	216	338	66	72
T 219	0.01	0.02	0.002	37
T 215	<0.001	-	-	-

Tab. 6: Werte für V_{max} (nmol min^{-1} mg Zellprotein^{-1}), k_{cat} (s^{-1}) und K_T (µM) mit GalSGal als Substrat in Zellen der Stämme ML308-225, T217, T219 und T215

Stamm	V_{max}^{app}	k_{cat}^{app}	K_T^{app}
K 125	8	8	264
T 217	58	9	496

Tab. 7: Werte für V_{max}^{app} (nmol min^{-1} mg Zellprotein^{-1}), k_{cat}^{app} (s^{-1}) und K_T^{app} (µM) mit GalSGal als Substrat in Zellen der Stämme ML308-225 und T217 in Gegenwart von Np«Gal (1 mM)

Im Stamm T215 erfolgt innerhalb des Meßbereichs von 10 min keine Aufnahme von GalSGal ins Zellinnere (Abb. 11). Die gemessene "Aufnahme" von GalSGal im Stamm T215 ist dabei auf unspezifische Bindung des Substrates an die Zellen und auf die Aufnahme von GalSGal in den periplasmatischen Raum zurückzuführen (s. 3.2.4., Abb. 8).

Die ermittelte Transportkonstante $K_T^{GalSGal}$ ist für die Stämme ML308-225, T217 und T219 annähernd gleich groß (Tab. 6). Dies zeigt, daß im Stamm T219 die GalSGal-Aufnahme durch die Y^{59}-Lactose-Permease katalysiert wird. Das $K_T^{GalSGal}$ entspricht dabei in etwa dem K_D-Wert für GalSGal (s. 3.2.1., Tab. 2). Wie für den Wildtyp läßt sich demnach auch für den mutierten Lactose-Träger kein $K_D \rightarrow K_T$-Effekt für GalSGal als Substrat feststellen.

Die Maximalgeschwindigkeit V_{max} ist im Stamm T217 wegen der höheren Konzentration an Lactose-Permease ca. 3.4 x höher als im Stamm ML308-225. Im Vergleich zum Stamm ML308-225 beträgt V_{max} im Stamm T219 nur 0.02 % der Maximalgeschwindigkeit im Stamm ML308-225.

Normiert man V_{max} auf die Zahl der Bindungsstellen, so zeigt die für GalSGal ermittelte katalytische Konstante k_{cat}, daß im Stamm T217 und ML308-225 die Lactose-Permease pro Sekunde die gleiche Zahl an Transportcyclen katalysiert, während k_{cat} für die mutierte Lactose-Permease stark erniedrigt ist (s. Tab. 6).

Wegen seiner höheren Affinität zur Lactose-Permease sollte Np∝Gal als kompetitives Hemmsubstrat zu GalSGal wirken; durch Np∝Gal sollte das $K_T^{GalSGal}$ auf einen scheinbaren (apparenten) K_T^{app} - Wert für GalSGal erhöht werden, während $V_{max}^{GalSGal}$ durch Np Gal nicht beeinflußt werden sollte.

Wie in Abb. 12 und in Tab. 7 zu sehen ist, kommt es durch Np∝Gal zu einer Veränderung von V_{max} und K_T . V_{max} wird im Stamm T217 durch Np∝Gal um einen Faktor 4 erniedrigt, im Stamm ML308-225 um einen Faktor 8. Die apparente Transportkonstante K_T^{app} wird um einen Faktor 7 (Stamm T217) bzw. um einen Faktor 4 (Stamm ML308-225) im Vergleich zum K_T-Wert für die ungehemmte GalSGal-Aufnahme erhöht. k_{cat} wird dabei durch Np∝Gal um einen Faktor 6 bzw. 7 erniedrigt. Im Stamm T219 wird durch Np∝Gal die geringe Transportaktivität vollständig gehemmt; die gemessene Aufnahme entspricht der Aufnahme von GalSGal im Hintergrundstamm T215 (nicht gezeigt).

3.2.6. Aktiver Transport von Lactose

Für Lactose, das natürliche Substrat der Lactose-Permease, wurde in Zellen der Y^{59}-Mutante die Geschwindigkeit der Aufnahme von Lactose gemessen. Da Lactose durch ß-Galactosidase in Glucose und Galactose hydrolysiert wird, wurden Zellen des Z^--Stammes T213 verwendet. Als Vergleich dienten die Stämme T206 ($lacZ^-Y^+$) und T184 ($lacZ^-Y^-$; Hintergrundstamm von T206 und T213; s. 2.1.1.). In den Abb. 13 - 14a ist die Kinetik der Aufnahme von Lactose dargestellt; Hemmung der Lactose-Aufnahme erfolgte durch NEtMal.

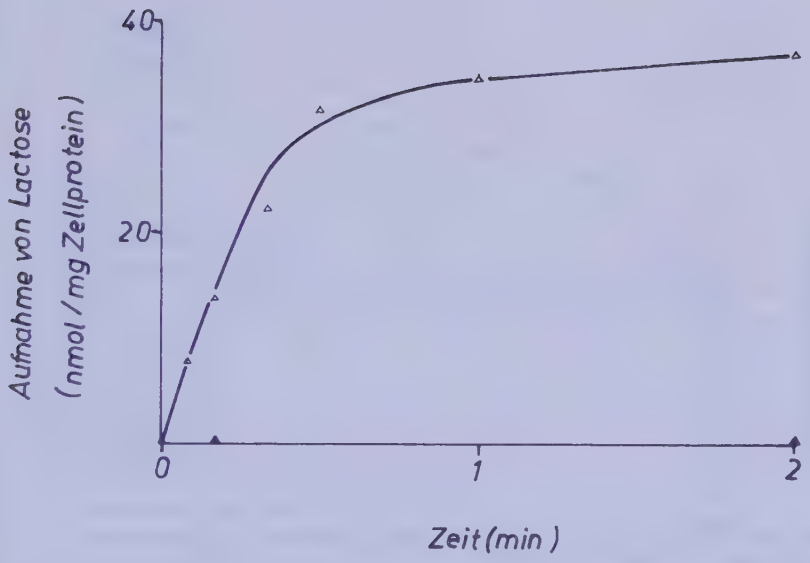


Abb. 13: Aufnahme von Lactose (100 µM, 9.3 kBq [6-^{3}H] Lactose pro Probe) in Zellen des Stammes T206 (Anzucht in T31RT-Medium) ohne (Δ - Δ) und mit (▲ - ▲) NEtMal (10 mM); GW: 0.5 nmol mg Zellprotein^{-1}

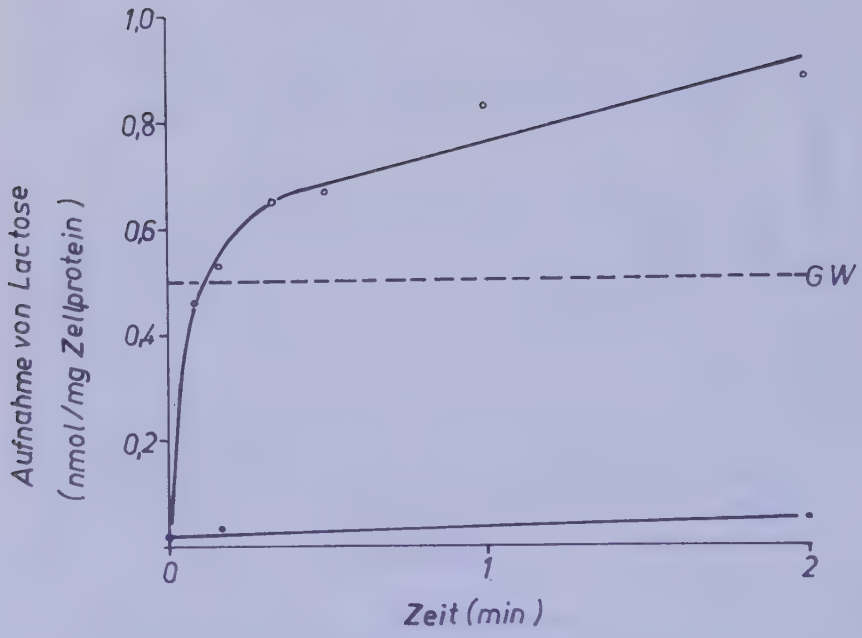


Abb. 14: Aufnahme von Lactose in Zellen des Stammes T184 (o-o); Aufnahme in Gegenwart von NEtMal (●-●); sonstige Bedingungen wie in Abb. 13

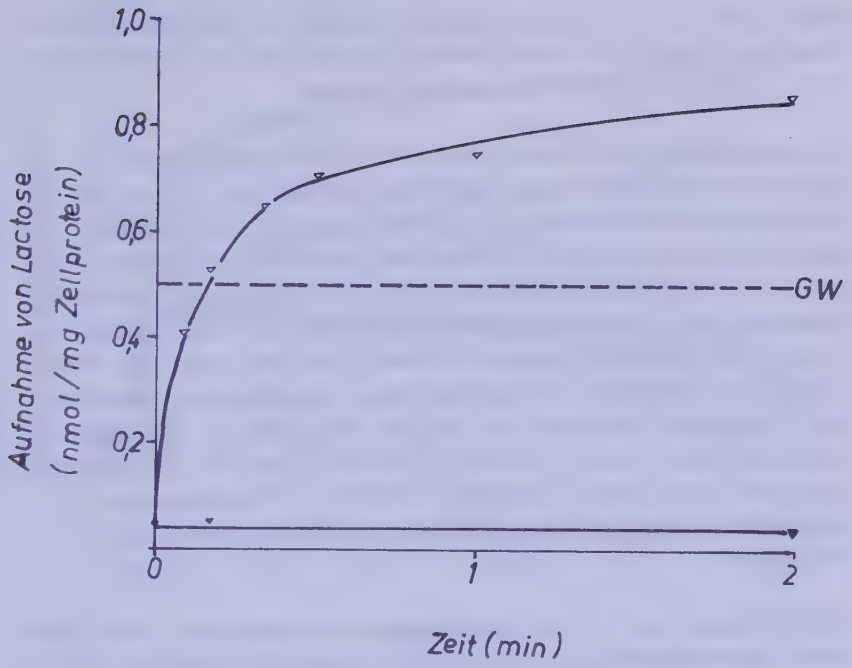


Abb. 14a: Aufnahme von Lactose in Zellen des Stammes T213 (▽ - ▽); Aufnahme in Gegenwart von NEtMal (▼ - ▼); sonstige Bedingungen wie in Abb. 13

Für die Anfangsgeschwindigkeiten v lassen sich die in Tabelle 8 angegebenen Werte ermitteln.

Stamm	v	%	Akkumulation
T 206	89.8	100	81
T 213	3.2	3.5	1.9
T 184	3.4	3.8	2

Tab. 8: Anfangsgeschwindigkeit v (nmol min^{-1} mg $Zellprotein^{-1}$) der Aufnahme von Lactose (100 µM) in Zellen der Stämme T206, T213 und T184

Der Wildtyp zeigt wie erwartet aktiven Transport von Lactose, wobei nach ca. 1 min die Lactose-Aufnahme in ein steady-state übergeht (Abb. 13). Durch NEtMal (10 mM) wird der Transport von Lactose im Stamm T206 völlig gehemmt.

Die beiden anderen Stämme T213 und T184 scheinen auch Lactose zu akkumulieren, da schon nach kurzer Zeit (10 s) die Gleichgewichtskonzentration von 0.5 nmol mg Zellprotein^{-1} überschritten wird. Die Kinetik der Aufnahme von Lactose ist dabei im Hintergrundstamm T184 ähnlich der Kinetik im Mutantenstamm T213. Korrigiert man die Aufnahme von Lactose im Stamm T213 um die Aufnahme im Stamm T184, so zeigt der Stamm T213 keine Aufnahme von Lactose mehr; die Werte entsprechen der gemessenen Aufnahme von Lactose in Gegenwart von NEtMal in den Stämmen T206, T213 und T184. Führt man für den Wildtypstamm T206 dieselbe Korrektur durch, so erniedrigt sich die Anfangsgeschwindigkeit um ca. 6 % auf 84.4 nmol min^{-1} mg Zellprotein^{-1}.

Die Aufnahme von Lactose in Zellen des Stammes T213 läßt sich dabei durch NpαGal nicht vollständig hemmen, obwohl die Affinität von NpαGal zur Y^{59}-Lactose Permease im Vergleich zur Affinität von Lactose ca. 140 x höher ist. Auch im Y^{-}-Stamm T184 läßt sich die Lactose-Aufnahme durch NpαGal nicht vollständig hemmen, wie in Abb. 15 zu sehen ist.

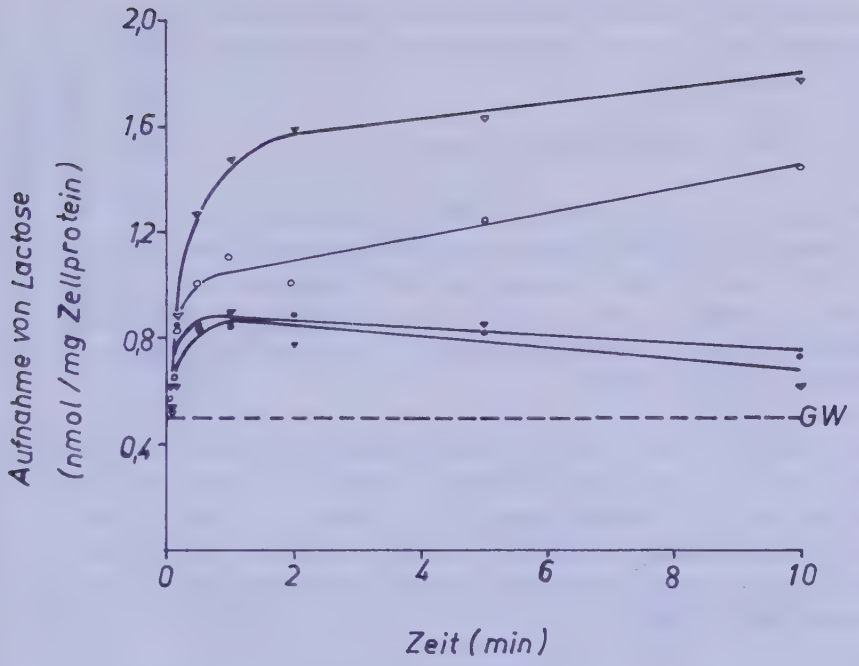


Abb. 15: Aufnahme von Lactose (100 µM, 9.3 kBq [6-^{3}H] Lactose pro Probe) in Zellen der Stämme T213 (▽ - ▽) und T184 (o-o); Aufnahme von Lactose in Gegenwart von Npα Gal (1 mM): T213 (▼ - ▼), T184 (●-●)

In beiden Stämmen erfolgt eine rasche Aufnahme von Lactose über die Gleichgewichtskonzentration von 0.5 nmol mg Zellprotein^{-1}, auch in Gegenwart von Npα Gal. Ein Hemmeffekt von Npα Gal macht sich dabei erst nach 0.5 min bemerkbar; die Aufnahme wird in beiden Stämmen im gleichen Ausmaß gehemmt und beträgt ca. 50 % der ungehemmten Lactose-Aufnahme.

Da schon im Hintergrundstamm T184, der als Y^{-}-Stamm keine funktionelle Lactose-Permease exprimieren sollte, ein so hoher Meßhintergrund vorhanden ist, ist eine genaue Bestimmung der Transportaktivität der Y^{59}-Lactose-Permease mit Lactose

als Substrat nicht möglich. Wie für NpßGal (s. 3.2.3.) läßt sich aus den gezeigten Kinetiken eine Transportaktivität von kleiner als 0.5 % im Vergleich zum Wildtyp angeben.

3.2.7. Aktiver Transport von Np∝Gal

Für die Y^{59}-Lactose-Permease ist, wie die Bestimmung der K_D-Werte von GalSGal, Lactose und Np∝Gal gezeigt hat (s. 3.2.1., Tab. 2), das affinste Substrat Np∝Gal. Die Kinetik der Aufnahme von Np∝Gal wurde in Zellen des Z^+-Stammes T219 bestimmt; als Kontrollen dienten die Stämme T217 und T215 (Anzucht der Stämme in T31RT-Medium).

Wie in Abb. 16 zu sehen ist, nimmt der Wildtypstamm T217 Np∝Gal aktiv auf mit einer Geschwindigkeit von ca. 1.1 nmol min^{-1} mg $Zellprotein^{-1}$. NEtMal hemmt die Aufnahme von Np∝Gal; erst nach 30 min Inkubation der mit NEtMal vorbehandelten Zellen mit Substrat wird Np∝Gal bis zur Gleichgewichtskonzentration passiv aufgenommen.

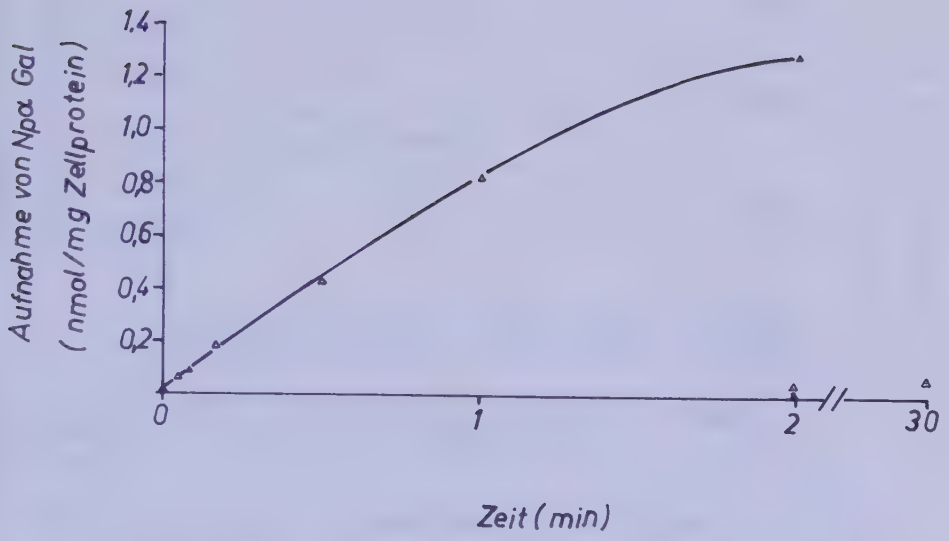


Abb. 16: Aufnahme von Npα Gal (20 µM, 1.2 kBq [6-^{3}H] Npα Gal pro Probe) in Zellen des Stammes T217 (Δ - Δ); Aufnahme in Gegenwart von NEtMal (10 mM): (▲ - ▲), in Gegenwart von Stoppuffer: (▲ - ▲); GW: 0.1 nmol mg Zellprotein^{-1}

Auch in Gegenwart von Stoppuffer (erst Zugabe von Stoppuffer, dann Inkubation mit Substrat, s. 2.2.2.9.) ist im Stamm T217 keine Aufnahme von Npα Gal feststellbar (innerhalb des Meßbereichs von 2 min). Die passive Permeabilität von Npα Gal ist in Zellen demnach geringer als in Membranvesikeln (36).

Die Aufnahme von Npα Gal in Zellen der Stämme T219 und T215 ist in Abb. 17 - 18 dargestellt.

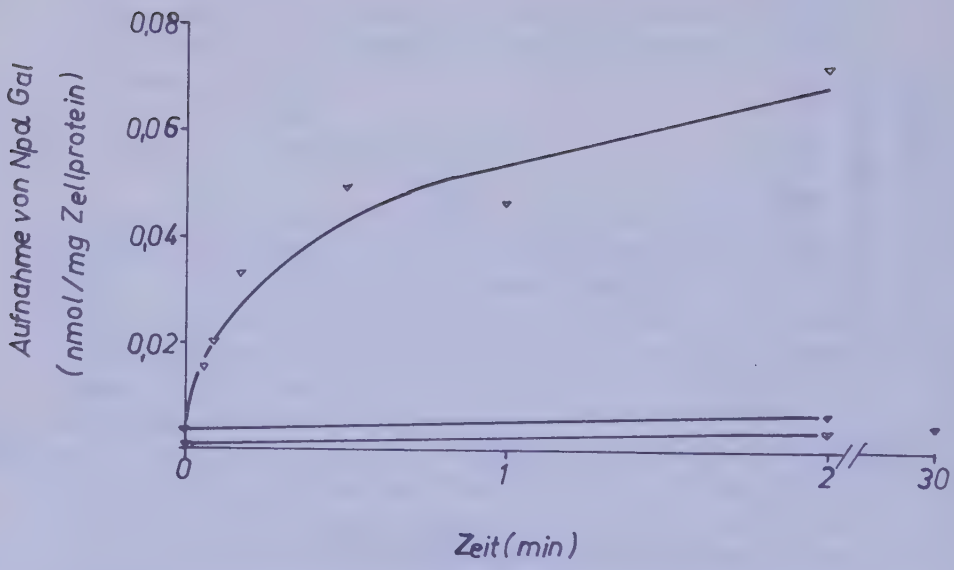


Abb. 17: Aufnahme von Npα Gal in Zellen des Stammes T219 (▽ - ▽); Aufnahme in Gegenwart von NEtMal: (▽ - ▽), in Gegenwart von Stoppuffer: (▼ - ▼); Versuchsbedingungen wie in Abb. 16 beschrieben

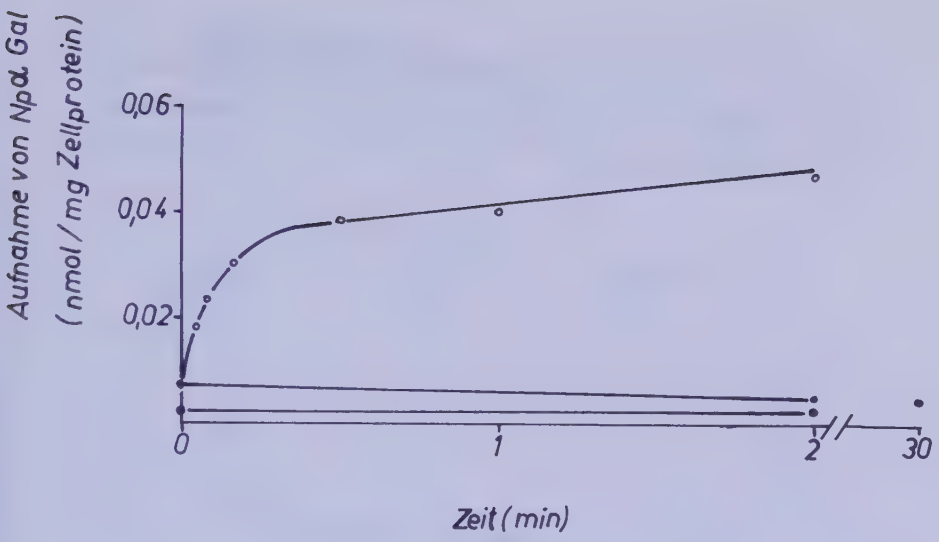


Abb. 18: Aufnahme von Npα Gal in Zellen des Stammes T215 (o-o); Aufnahme in Gegenwart von NEtMal: (⊙-⊙), in Gegenwart von Stoppuffer: (●-●); Versuchsbedingungen wie in Abb. 16 beschrieben

Die Npα Gal-Aufnahme ist, wie Abb. 17 und 18 zeigen, in den Stämmen T219 und T215 vergleichbar. Beide Stämme nehmen das Substrat sehr langsam auf, wobei die Gleichgewichtskonzentration von 0.1 nmol mg Zellprotein^{-1} innerhalb der Meßzeit nicht erreicht wird. Durch NEtMal und durch Stoppuffer wird die Aufnahme von Npα Gal vollständig gehemmt; selbst nach 30 min Inkubation der Zellen mit Substrat in Gegenwart von NEtMal erfolgt keine Aufnahme von Npα Gal.

3.2.8. Efflux von GalSGal, Lactose und Npα Gal

Da die Aktivität der Permease symmetrisch ist, katalysiert sie sowohl die Aufnahme von Substrat in das Zellinnere als auch den Ausstrom von Substrat aus mit Substrat beladenen Zellen.

Die Bestimmung der Halbwertszeit $t_{1/2}$, also der Zeit, in der das Substrat auf die Hälfte seiner Ausgangskonzentration abgesunken ist, wurde mit folgenden Substraten und Stämmen bestimmt (angegeben ist die jeweilige Endkonzentration an Substrat bei der Beladung):

Stamm	Substrat		
	GalSGal (2 mM)	Lactose (10 mM)	NpαGal (50 µM)
T 215	+	-	+
T 217	+	-	+
T 219	+	-	+
T 184	+	+	-
T 206	+	+	-
T 213	+	+	-

Zusätzlich wurde die Kinetik des GalSGal-Effluxes aus EDTA-Zellen von T219 mit einer Endkonzentration an GalSGal von 1 mM bestimmt (Zeitbereich 30 min).

Die Kinetik des Effluxes von GalSGal aus Zellen der Z^+- und Z^--Stämme ist in den Abb. 19 und 20 dargestellt. Bei den in Tabelle 9 angegebenen Halbwertszeiten in ( ) handelt es sich um extrapolierte Werte.

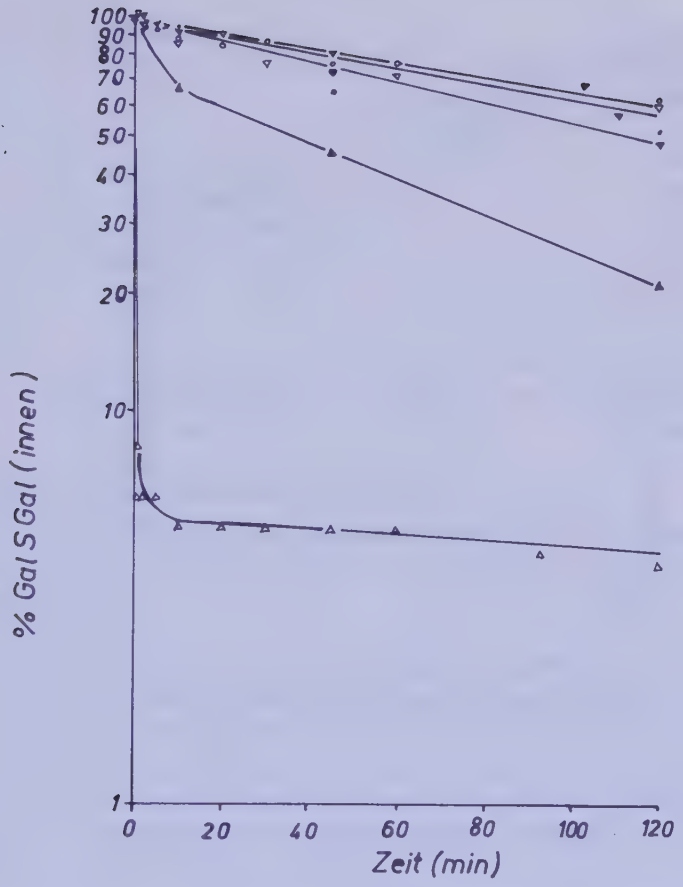


Abb. 19: Efflux von GalSGal (2 mM, 9.3 kBq [6,6'-$^3H_2$] GalSGal pro Beladungsansatz) aus Zellen der Stämme T217 (△ - △), T219 (▽ - ▽) und T215 (o-o); Kontrollwerte für den passiven Efflux von GalSGal (erst Zugabe von Stoppuffer zu den beladenen Zellen, dann Verdünnen der Zellen in KP_i-Puffer): T217 (▲ - ▲), T219 (▼ - ▼), T215 (●-●); Anzucht der Stämme in T31RT-Medium; Versuchsdurchführung wie in 2.2.2.10. beschrieben

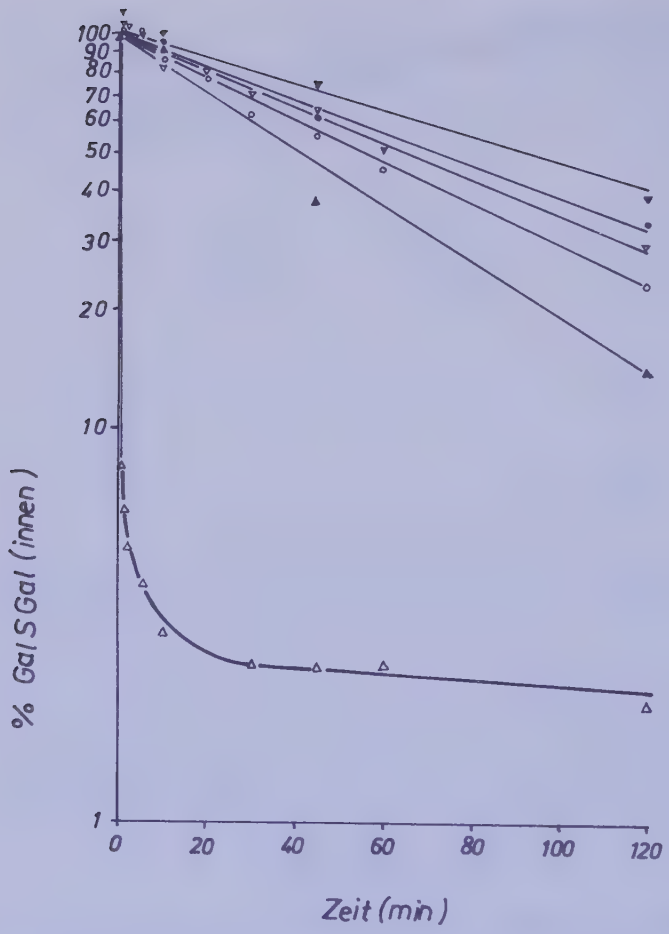


Abb. 20: Efflux von GalSGal aus Zellen der Stämme T206 (△ - △), T213 (▽ - ▽), T184 (o-o); Kontrollwerte: T206 (▲ - ▲), T213 (▼ - ▼), T184 (●-●); Versuchsbedingungen wie in Abb. 19 angegeben

Stamm	$t_{1/2}$
T 215	>100 (160)
T 217	≪0.5
T 219	>100 (175)
T 219 (EDTA-Zellen)	(82)
T 184	56
T 206	≪0.5
T 213	64

Tab. 9: $t_{1/2}$-Werte (min) für den Efflux von GalSGal (aus Abb. 19 und 20)

Beide Wildtypstämme zeigen einen raschen Ausstrom von GalSGal, der in Gegenwart von Stoppuffer gehemmt wird, so daß GalSGal nur noch mit einer Halbwertszeit von ca. 40 min aus den Zellen ausströmt.

Die beiden Y^{59}- und Y^{-}-Stämme T219, T213 und T215, T184 zeigen im Vergleich zu ihren entsprechenden Wildtypstämmen einen sehr geringen GalSGal-Efflux, wobei die Halbwertszeiten in vergleichbaren Stämmen (T219/T215 bzw. T213/T184) annähernd gleich sind. Die Z^{+}-Stämme T219 und T215 zeigen dabei einen geringeren Ausstrom von GalSGal als die Z^{-}-Stämme T213 und T184.

In EDTA-Zellen des Stammes T219 ist dabei die Halbwertszeit um einen Faktor 2 geringer als in Zellen vom Stamm T219 (Kinetik des Effluxes von GalSGal aus EDTA-Zellen nicht gezeigt).

Der passive Efflux von GalSGal aus Zellen der Y^{-}- und Y^{59}-Stämme zeigt dabei eine ähnliche Kinetik wie der nicht gehemmte GalSGal-Ausstrom.

Der Efflux von Lactose aus Zellen der Stämme T184, T206 und T213 ist in Abb. 21 gezeigt; die zugehörigen $t_{1/2}$-Werte sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

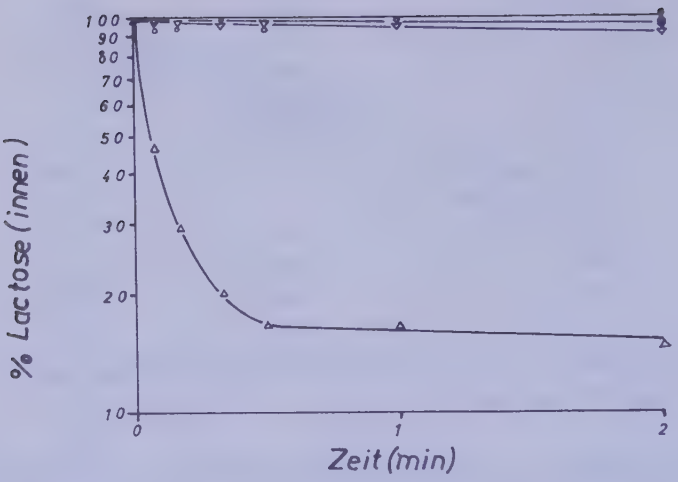


Abb. 21: Efflux von Lactose (10 mM, 9.3 kBq [6-^{3}H]Lactose pro Beladungsansatz) aus Zellen der Stämme T206 (Δ - Δ), T213 (▽ - ▽) und T184 (o-o); Kontrollwerte (s. Abb. 19): T206 (▲ - ▲), T213 (▼ - ▼), T184 (●-●); Anzucht der Stämme in T31RT-Medium, Versuchsdurchführung wie in 2.2.2.10. beschrieben

Stamm	$t_{1/2}$
T 184	>2 (17)
T 206	0.08
T 213	>2 (22)

Tab. 10: $t_{1/2}$-Werte (min) für den Efflux von Lactose (aus Abb. 21, Werte in Klammern sind extrapoliert)

Aus Zellen des Stammes T206 erfolgt ein sehr rascher Ausstrom von Lactose; die Kinetik ähnelt dem Ausstrom von GalSGal (s. Abb. 20). Durch Stoppuffer wird der Lactose-Efflux gehemmt; nach 2 min ist noch mehr als 95 % der Lactose in den Zellen vorhanden.

Innerhalb der Meßzeit von 2 min ist aus Zellen der Stämme T213 und T184 kein nennenswerter Efflux von Lactose zu beobachten. Dies gilt sowohl für den ungehemmten Ausstrom von Lactose als auch für den Efflux von Lactose aus mit Stoppuffer vorbehandelten Zellen.

In Abb. 22 ist schließlich die Kinetik des Ausstroms von Np∝Gal aus Zellen der Stämme T215, T217 und T219 dargestellt; die Halbwertszeiten sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

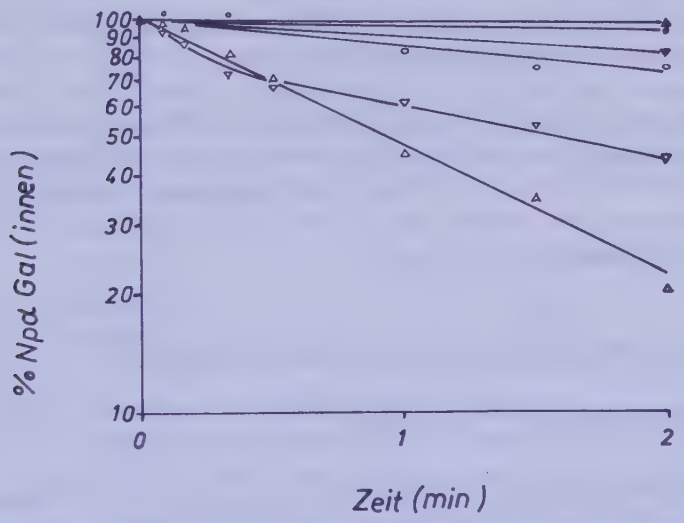


Abb. 22: Efflux von Np∝Gal (50 µM, 0.6 kBq [6-^{3}H] Np∝Gal pro Beladungsansatz) aus Zellen der Stämme T217 (△ - △), T219 (▽ - ▽) und T215 (o-o); Kontrollwerte (s. Abb. 19): T217 (▲ - ▲), T219 (▼ - ▼), T215 (●-●); Anzucht der Stämme in T31RT-Medium, Versuchsdurchführung wie in 2.2.2.10. beschrieben

Stamm	$t_{1/2}$
T 215	3.3
T 217	0.9
T 219	1.6

Tab. 11: $t_{1/2}$-Werte (min) für den Efflux von Np∝Gal (aus Abb. 22)

Wie in Abb. 22 zu sehen ist, dauert es fast 1 min, bis die Konzentration an Np∝Gal in den Zellen des Stammes T217 auf die Hälfte der Ausgangskonzentration gesunken ist. Durch Stoppuffer wird der Efflux von Np∝Gal gehemmt; nach 2 min ist noch über 90 % des Substrates in den Zellen vorhanden.

Aus Zellen des Stammes T219 läßt sich eine Halbwertszeit von 1.6 min bestimmen, die damit nur geringfügig größer ist als $t_{1/2}$ für den Stamm T217. Durch Stoppuffer läßt sich ebenfalls der Np∝Gal-Efflux hemmen; mehr als 80 % des Substrats ist nach 2 min noch in den Zellen vorhanden.

Aus Zellen des Stammes T215 ist innerhalb der Meßzeit nur ein geringer Ausstrom von Np∝Gal im Vergleich zu den Stämmen T219 und T217 zu beobachten, die Kinetik ist vergleichbar mit dem Ausstrom von Np∝Gal aus mit Stoppuffer behandelten Zellen des Stammes T219.

3.3. Genetische Charakterisierung der Y^{59}-Mutante

3.3.1. Kartierung der Y^{59}-Mutation

Die charakteristischen Eigenschaften der Y^{59}-Lactose-Permease (keine Translokation der gebundenen Substrate) lassen sich letztendlich auf eine Änderung der Nucleotidsequenz im Y-Gen, hervorgerufen durch das Mutagen Hydroxylamin, zurückführen.

Um die Y^{59}-Mutation im Gen zu lokalisieren, wurde eine Deletionskartierung mit einem F'Y^{59}-Stamm und mit den Y^{59}-Gen tragenden Plasmiden pGM 21/59 und pTE 18/59 durchgeführt. Die Konstruktion des F'Y^{59}-Stammes erfolgte dabei durch Kreuzung der Y^{59}-Mutation des Plasmids pGM 21/59 auf einen F'-Faktor (Homogenotenbildung, s. 2.2.1.6.).

Ausgangsstamm für die Isolierung eines F'Y^{59}-Stammes war der für die Klonierung des Y-Gens verwendete Stamm T126, der mit

dem Plasmid pGM 21/59 transformiert wurde (bis auf die Y^{59}-Mutation ist somit das Eco RI-Fragment des Plasmids homolog zum lac-Operon auf dem F'-Faktor des Stammes T126). Eine Heterogenote wurde anschließend viermal über Nacht in 2 ml NBA-Tet-Medium angezogen (jeweils 10^4 er Verdünnungen) und anschließend mit dem F^--Stamm DP90CNal gekreuzt (s. 2.2.1.5.). Plattiert wurde auf Minimal-Glucose-Nal-Platten (20 µg/ml Nalidixinsäure) zur EK (ca. 300 Kolonien/Platte) und nach 48 h auf Minimal-Melibiose-Nal-Platten gestempelt. Nach Inkubation bei 42°C für 48 h wurde unter ca. 7 000 Klonen ein Klon gefunden, der auf Minimal-Melibiose-Nal-Platten kein Wachstum zeigte und demnach phänotypisch Y^- war (Bezeichnung des Klons: T34UW). Die Bestimmung der Anzahl der Bindungsstellen in der Flußdialyse mit Np∝Gal als Substrat in Zellmembranen des Stammes T34UW zeigte, daß der Stamm T34UW ein $F'Y^{59}$-Episom trägt (Tabelle 12).

Stamm	Anzahl der Bindungsstellen
DP90CNal	<0.05
T34UW	0.133

Tab. 12: Bindung von Np∝Gal (2.8 µM) in Zellmembranpräparationen der Stämme T34UW und DP90CNal (als Kontrolle); Anzucht der Stämme in CR-Glycerin (0.5 %)-Thiamin (0.01 mg/ml)-Medium, Induktion mit PrSGal (5×10^{-4} M)

Für die Kartierung wurden Deletionsstämme des Y-Gens verwendet, deren Deletionen sich sowohl vom 3'-Ende als auch vom 5'-Ende in das Y-Gen erstrecken. In Abb. 23 sind die von Hobson et al. (17) isolierten Y-Deletionsstämme gezeigt; die für die Kartierung der Y^{59}-Mutation verwendeten Deletionsstämme sind gekennzeichnet.

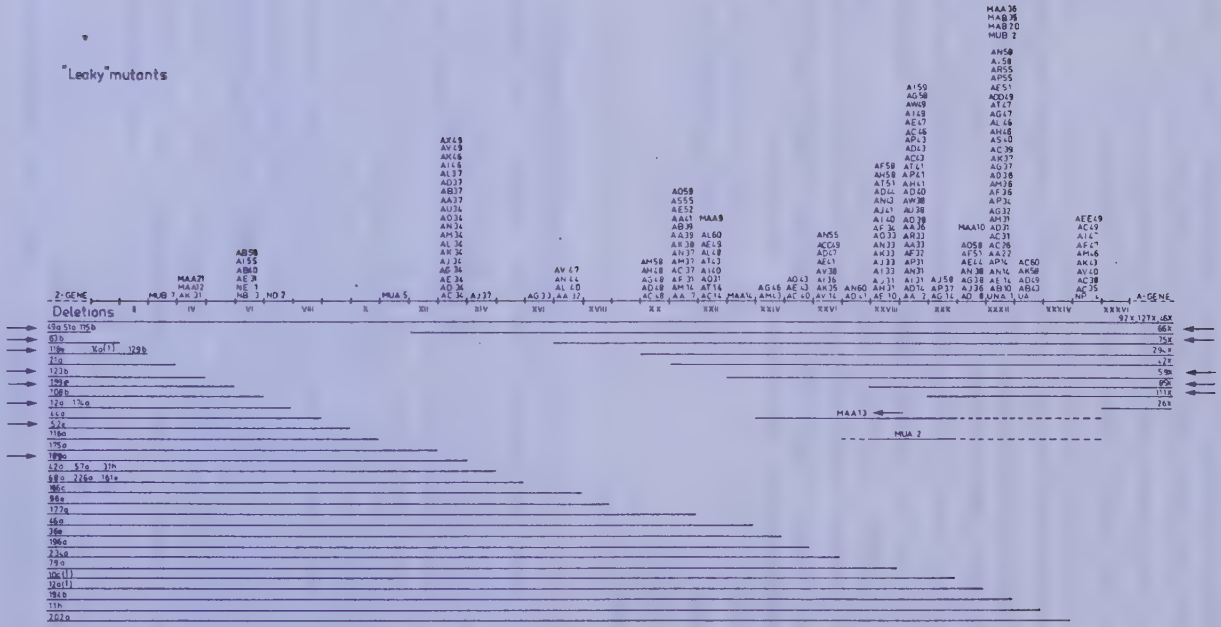


Abb. 23: Deletionskarte des Y-Gens (aus (17)).
Mit → gekennzeichnete Deletionsstämme wurden für die Kartierung der Y^{59}-Mutation verwendet.

Für die Deletionskartierung mit den das Y^{59}-Gen tragenden Plasmiden wurden die Deletionsstämme mit den Plasmiden

pGM 21
pGM 21/59
pTE 18
pTE 18/59
pACYC 184
pBR 322

transformiert (Selektion auf NBA-Tet-Platten). Nach Reinigung der Transformanten wurden diese in 2 ml NBA-Tet-Medium angezogen. Transformanten im Z^--Hintergrund wurden auf Minimal-Melibiose-pro-trp-Tet-Platten getropft (ca. 30 µl), während die übrigen Transformanten auf Minimal-Lactose-pro-trp-Tet-Platten getropft wurden (Transformanten von MAA13 auf Minimal-Lactose-trp-Tet-Platten). Inkubiert wurde bei 42°C (Melibiose-Platten) bzw. bei 37°C (Lactose-Platten).

Nach Inkubation für 48 h zeigte sich, daß eine eindeutige Rekombination zum Y^+-Phänotyp nur bei Transformanten der Deletionsstämme 63b, 66X, 75X, 111X und MAA13 feststellbar war. Keine Rekombination war zu beobachten bei den Stämmen 123b, 12a, 52e und 189a; die entsprechenden positiven Kontrollen (Deletionsstämme mit den Y^+-Plasmiden) waren gewachsen. Da bei allen anderen Ansätzen die Kontrollen nicht gewachsen waren, war keine Aussage möglich.

Spontane Reversionen der Deletionsstämme zum Wildtyp waren nicht feststellbar; die mit den Plasmidvektoren pACYC 184 und pBR 322 transformierten Stämme zeigten auf den entsprechenden Platten kein Wachstum.

Da bei einigen transformierten Deletionsstämmen die positiven Kontrollen nicht gewachsen waren, wurde, um einen Einfluß der Plasmide auszuschließen, durch Kreuzung der Deletionsstämme mit dem oben beschriebenen $F'Y^{59}$-Stamm T34UW versucht, eine detailliertere Kartierung durchzuführen.

Die Selektion erfolgte auf Minimal-Lactose-trp-Platten bzw. auf entsprechenden Minimal-Melibiose-Platten. Eine eindeutige Rekombination zum Y^+-Phänotyp war dabei nur mit den Stämmen 63b, 66X, 75X, 111X und MAA13 feststellbar. In allen anderen Ansätzen konnte keine Rekombination beobachtet werden.

Die bei den Rekombinationstests erhaltenen Ergebnisse lassen folgende Schlüsse zu.

Wegen der eindeutigen Rekombination zum Y^+-Phänotyp der Y^{59}-Mutation mit Deletionsstämmen, deren Deletionen sich vom 3'-Ende in das Gen erstrecken (66X, 75X, 111X, MAA13), liegt die Mutation im Bereich der Deletionsgruppen I - X/XI (s. Abb. 23). Da mit 63b, dessen Deletion sich bis zur Deletionsgruppe II erstreckt, noch Rekombination möglich ist, mit 123b (Deletion bis zur Deletionsgruppe V) aber keine Rekombination mehr zu beobachten ist, wird der Bereich, in der die Y^{59}-Mutation liegt, auf den Bereich zwischen Deletionsgruppe I/II - IV/V eingeschränkt. Die für die Eigenschaften der Y^{59}-Lactose-Permease verantwortliche Mutation liegt demnach am Beginn des Y-Gens, also in dem Bereich, der dem NH_2-Terminus der Lactose-Permease entspricht.

3.3.1.1. Kartierung durch <u>in vitro</u> Rekombination mit Restriktionsfragmenten

Der aus der Deletionskartierung gezogene Schluß, daß die Y^{59}-Mutation im 5'-Ende des Y-Gens liegt, wurde durch folgenden Versuch bestätigt.

Mit Ava I wurden die Plasmide pTE 18 und pTE 18/59 verdaut, wobei jedes Plasmid in zwei Fragmente gespalten wird (s. 3.1., Abb. 5). Die größeren Fragmente tragen dabei die den CO_2H-Terminus der Lactose-Permease kodierende DNA-Sequenz (Bezeichnung der Fragmente: FC18, FC59; 4352 Bp), während die kleineren Fragmente den dem NH_2-Terminus entsprechenden Genbereich tragen (Bezeichnung: FN18, FN59; 2340Bp). Die Isolierung der Fragmente erfolgte wie in 2.2.2.21. beschrieben; die Fragmente FC18 und

FC59 wurden dabei aus einem Ava I/Bam HI-Verdau isoliert (Bam HI spaltet das kleinere Fragment in zwei Subfragmente von 1291 Bp und 1049 Bp; s. Abb. 24 und 25).

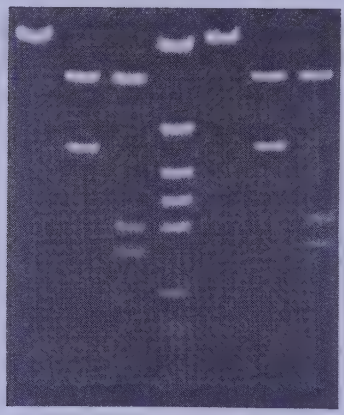


Abb. 24: 1 % Agarose-Gel; 1: pTE 18 - Bam HI
2: pTE 18 - Ava I
3: pTE 18 - Ava I/Bam HI
4: pTE 18/59 - Bam HI
5: pTE 18/59 - Ava I
6: pTE 18/59 - Ava I/Bam HI
LS: Längenstandard (6-2.9-2.09-1.65-1.32-0.75-0.52-0.25 Kb)

Abb. 25: 1 % Agarose-Gel; 1: FC18
2: pTE 18 - Ava I
3: FN18
4: FC59
5: pTE 18/59 - Ava I
6: FN59
LS: Längenstandard (6-2.9-2.09-1.65-1.32-0.75-0.52-0.25 Kb)

Die isolierten Fragmente wurden in folgenderweise ligiert:

Ansatz a) FN18 + FC18
" b) FN59 + FC59
" c) FN18 + FC59
" d) FN59 + FC18

Nach Transformation des Stammes T215 mit den Ligationsansätzen wurden die Transformanten auf EMB-Lactose-Tet-Platten gestempelt. Das Ergebnis ist aus Tab. 13 zu ersehen.

Ansatz	Transformanten/ Platte	% Lac^+ bzw. Lac^- Klone
a	ca. 300	50 % Lac^+ 50 % Lac^-
b	"	100 % Lac^-
c	ca. 200	50 % Lac^+ 50 % Lac^-
d	"	100 % Lac^-

Tab. 13: Verhältnis der Lac^+/Lac^--Klone der Ligationsansätze a) - d). Die Isolierung des Fragments FC18 (bzw. FC59) aus einem Ava I/Bam HI-Verdau des entsprechenden Plasmids war notwendig, da ca. 3 % der Transformanten Lac^+ waren, wenn FC18, aus einem Ava I-Verdau des Plasmids pTE 18 isoliert, mit FN59 ligiert wurde, die Ursache für diese Verunreinigung des Fragments FC18 durch FN18 ist dabei unbekannt

Das Verhältnis der Lac^+/Lac^--Klone in Ansatz a) entspricht wegen der zwei möglichen Kombinationen der Fragmente den Erwartungen, ebenso das Ergebnis von Ansatz b), wobei von den Lac^--Klonen nur 50 % über ein intaktes Y^{59}-Gen verfügen. Ansatz c) zeigt, daß im 3'-Ende des Y^{59}-Gens keine für den Y^{59}-Phänotyp verantwortliche Mutation liegen kann; das Verhältnis der Lac^+-Klone zu den Lac^--Klonen entspricht dem von a). Das Ergebnis von d) dagegen zeigt, daß im 5'-Ende des

Y-Gens die für den Phänotyp der Y^{59}-Mutante verantwortliche Mutation liegt, da die Kombination von FC18 mit FN59 nur Klone ergibt, die einen Lac^--Phänotyp aufweisen. Wie in b) verfügen auch in d) nur 50 % der Klone über ein intaktes, aus FC18 und FN59 neukombiniertes Y^{59}-Gen.

Von Ansatz d) wurden 20 Klone gereinigt, in 2 ml NBA-Tet-Medium angezogen und wie in 2.2.2.12. beschrieben, die Plasmide isoliert. Nach Spalten der Plasmide mit Eco RI zeigten 9 der Plasmide das charakteristische Eco RI-Fragment (s. 3.1., Abb. 5), d. h., das mutierte Y-Gen war rekonstituiert worden.

Dies zeigte sich auch hinsichtlich Bindung und Transport von Substrat, wie aus Tab. 14 zu ersehen ist.

Stamm	Transport NpßGal		Bindung Npα Gal	ß-Galactosidase
	V_{max}	K_T		
T30UW	2.7	1.6	1.3	18
T31UW	<0.05		0.96	12

Tab. 14: Bindung (nmol mg Zellmembranprotein^{-1}) und Transport (V_{max} in µmol min^{-1} mg Zellprotein^{-1}, K_T in mM) in den Stämmen T30UW (Lac^+-Klon aus Ansatz c)) und T31UW (Klon aus Ansatz d) mit intaktem Eco RI-Fragment); ß-Galactosidase-Aktivität in µmol min^{-1} mg Zellprotein^{-1};

Der Stamm T30UW, der das aus FN18 und FC59 gebildete Y-Gen trägt, zeigt Wildtypeigenschaften, während der Stamm T31UW, der das aus FN59 und FC18 gebildete Y-Gen trägt, den typischen Y^{59}-Phänotyp zeigt. Somit wurde der aus der Deletionskartierung gezogene Schluß, daß die für den Y^{59}-Phänotyp verantwortliche Mutation im 5'-Ende des Y-Gens liegt (s. 3.1.1.), bestätigt.

3.3.2. DNA-Sequenz der Y^{59}-Mutation

Die Kartierung der Y^{59}-Mutation durch *in vitro* Rekombination mit Restriktionsfragmenten hat ergeben, daß die für den Y^{59}-Phänotyp verantwortliche Mutation im Bereich von Codon 1 bis Codon 70 des Y-Gens liegt (Ava I spaltet in Codon 70 des Y-Gens).

Um diesen DNA-Bereich, der 207 Basenpaare umfaßt (s. 3.1., Abb. 5) zu sequenzieren, wurde das Plasmid pTE 18/59 mit Cla I verdaut (da Cla I nur nichtmethylierte DNA spaltet, wurde pTE 18/59 in einen dam^--Stamm transformiert und aus diesem Stamm isoliert). Man erhält zwei Fragmente, wobei das kleinere Fragment von 1049 Bp die den NH_2-Terminus der Lactose-Permease kodierende DNA-Sequenz trägt (Abb. 26 bzw. 3.1., Abb. 5). Dieses Fragment wurde isoliert und mit Alu I verdaut, wodurch das isolierte Cla I-Fragment in 8 Subfragmente gespalten wird (Abb. 26). Das größte dieser Subfragmente (342 Bp) trägt den DNA-Bereich des Y-Gens, in dem die Mutation liegt.

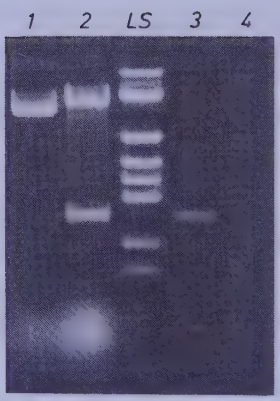


Abb. 26: 1 % Agarose-Gel; 1: pTE 18/59 (dam^-)
2: pTE 18/59 (dam^-) - Cla I
3: isoliertes Cla I-Fragment mit dem 5'-Ende des Y^{59}-Gens
4: Cla I-Fragment - Alu I
LS: Längenstandard (15.5-6-2.9-2.09-1.65-1.32-0.75-0.52-0.25 Kb)

Der Cla I/Alu I-Verdau wurde anschließend in die mit Acc I/Sma I geschnittene Phagen-DNA M13 mp8 ligiert (26) und nach Sanger et al. (50) (2.2.2.25) sequenziert.

Die DNA-Sequenz zeigt im Vergleich zur Wildtypsequenz (5) drei Basenaustausche (Abb. 27):

	Y^+	Y^{59}
Codon 7 (Base 20) :	ACA	ATA
Codon 11 (Base 33) :	ATG	ATA
Codon 24 (Base 70) :	GGA	AGA

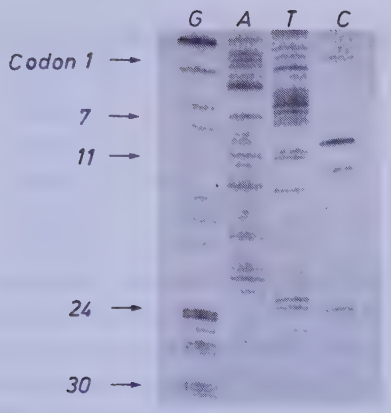


Abb. 27: Autoradiographie eines Sequenzgels
Gezeigt ist der Bereich von Codon 1 bis Codon 30 des Y^{59}-Gens; die übrige DNA-Sequenz (Codon 31 - Codon 70) entspricht der Wildtypsequenz.
Die DNA-Sequenz, komplementär zur Sequenz, die man vom Sequenzgel ablesen kann, lautet:

1
ATG TAC TAT TTA AAA AAC ATA AAC TTT TGG

11
ATA TTC GGT TTA TTC TTT TTC TTT TAC TTT

21
TTT ATC ATG AGA GCC TAC TTC CCG TTT TTC

Bei den drei Basensubstitutionen handelt es sich um NH_2OH-induzierte Transitionen, also um einen Austausch einer Purinbase gegen ein anderes Purinderivat bzw. einer Pyrimidinbase gegen eine andere Pyrimidinbase (28).

In der Aminosäuresequenz führen diese Transitionen zu folgenden Veränderungen:

		Y^+	Y^{59}
Codon 7	:	Thr	Ile
Codon 11	:	Met	Ile
Codon 24	:	Gly	Arg

In der Y^{59}-Lactose-Permease wird demnach anstelle des neutralen Threonins (polarer Rest) und des hydrophoben Methionins (unpolarer Rest) das ebenfalls hydrophobe, unpolare Isoleucin eingebaut, während für Glycin (hydrophob, unpolarer Rest) das basische, hydrophile Arginin (polarer Rest) eingebaut wird. Durch diesen Austausch wird eine zusätzliche positive Ladung in das Protein eingeführt, während die Austausche im Codon 7 und Codon 11 die Ladung des Proteins nicht verändern.

3.3.3. Bestimmung der Reversionsfrequenz der Y^{59}-Mutante

Im Vergleich zur Wildtypsequenz zeigt die DNA-Sequenz des Y^{59}-Gens drei Basensubstitutionen. Durch erneute Mutation an gleicher Stelle kann dabei der ursprüngliche Wildtypzustand wiederhergestellt werden. Solche Rückmutationen (Reversionen) treten mit einer bestimmten Häufigkeit auf; für einzelne Punktmutationen liegt die spontane Reversionsfrequenz in der Regel bei 10^{-5} - 10^{-6}.

Somit läge, wenn alle drei Basenaustausche im Y-Gen der Y^{59}-Mutante revertieren müßten, um wieder zum Phänotyp "Wildtyp" zu gelangen, die zu erwartende Reversionsfrequenz bei ca. 10^{-18}.

Da sich die Reversionsfrequenz im allgemeinen auf eine Genkopie bezieht, wurde für die Analyse der Reversionshäufigkeit der Y^{59}-Mutante der $F'Y^{59}$-Stamm T34UW verwendet. Tab. 15 zeigt das Ergebnis dieser Analyse.

Zellen/Platte	Revertanten/Platte
2×10^8	147
2×10^7	29
2×10^6	4
2×10^5	1
2×10^4	-
2×10^3	-
2×10^2	-

Tab. 15: Bestimmung der Reversionsfrequenz der Y^{59}-Mutante. Anzucht des Stammes T34UW in NBA-Nal-Medium; nach Waschen und Resuspendieren in 0.9 % NaCl wurden nach Bestimmen der optischen Dichte entsprechende Verdünnungen auf Minimal-Melibiose-Nal-Platten plattiert und für 48 h bei 42°C inkubiert.

Die Reversionsfrequenz liegt demnach zwischen 10^{-5} und 10^{-6}, d. h., ein Basenaustausch im Y^{59}-Gen genügt, um zum Wildtyphänotyp wieder zurück zu gelangen.

Die Reversionsfrequenz sagt dabei nichts darüber aus, welche der drei Mutationen revertiert ist; möglich wäre auch, daß eine neue Mutation einen kompensierenden Effekt auf die drei Basenveränderungen im Y^{59}-Gen ausübt.

An einer Revertante (Bezeichnung: T35UW) wurde durch Bestimmung des Lactose-Transports gezeigt, daß die Revertanten des $F'Y^{59}$-Stammes nicht nur phänotypisch Wildtypeigenschaften zeigen.

3.3.3.1. Transport von Lactose durch die Revertante T35UW

Die Bestimmung des Lactose-Transports erfolgte in Zellen; als Kontrollen wurden die Stämme

- DP90CNal (Δ Lac-Stamm)
- T32UW (F'Y^{+}-Stamm)
- T34UW (F'Y^{59}-Stamm)

verwendet (s. 2.2.1.). In den Abb. 28 - 31 sind die entsprechenden Kinetiken dargestellt.

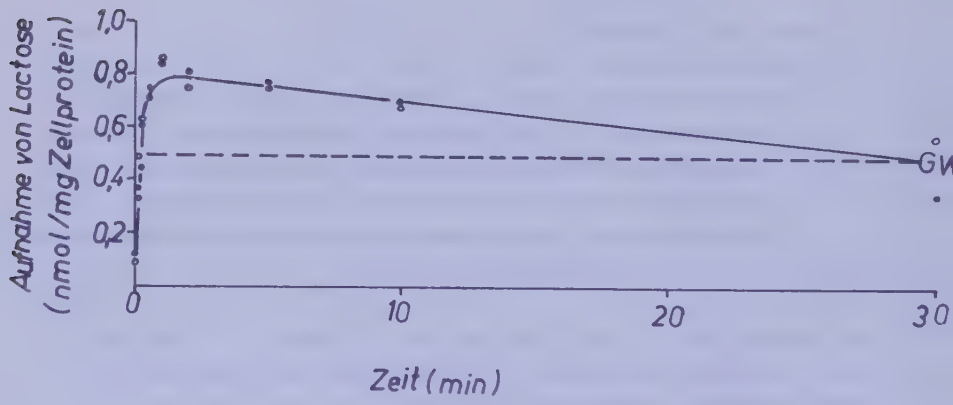


Abb. 28: Transport von Lactose (100 µM, 9.3 kBq[6-^{3}H]Lactose pro Probe) in Zellen des Stammes DP90CNal (o-o), in Gegenwart von NpαGal (1 mM) (●-●); Anzucht in CR-Glycerin (0.5 %)-Thiamin (0.01 mg/ml)-Medium

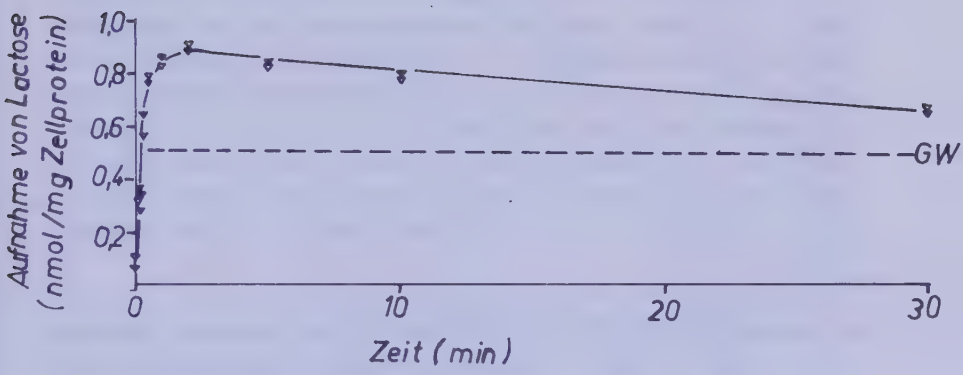


Abb. 29: Lactose-Transport in Zellen des Stammes T34UW (▽ - ▽), in Gegenwart von NpαGal (▼ - ▼); Bedingungen wie in Abb. 28

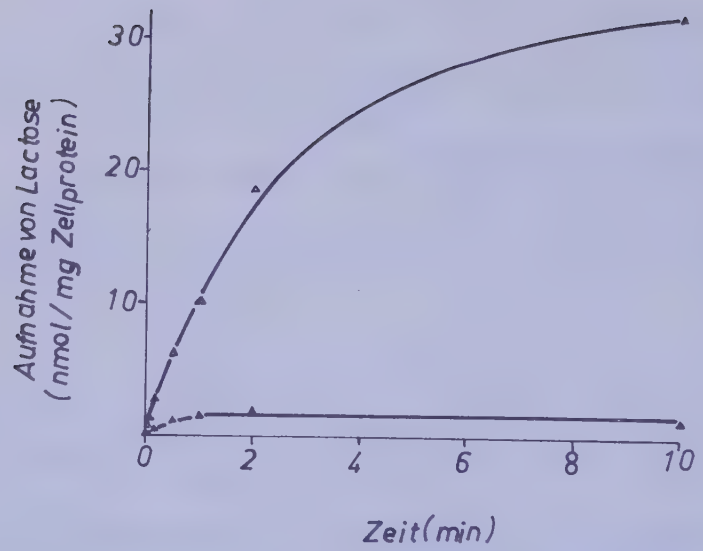


Abb. 3

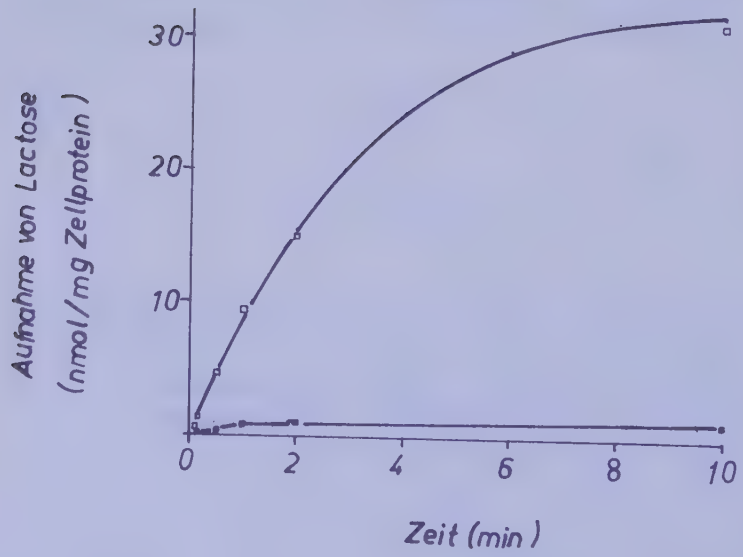


Abb. 3

Abb. 30 und 31: Lactose-Transport in Zellen der Stämme T32UW (△ - △) und T35UW (□ - □), in Gegenwart von NpαGal: T32UW (▲ - ▲), T35UW (■ - ■); GW: 0.5 nmol mg Zellprotein^{-1}; Bedingungen wie in Abb. 28

Wie der Abb. 28 zu entnehmen ist, zeigt der Stamm DP90CNal eine sehr rasche Aufnahme von Lactose; nach 10 s wird die Gleichgewichtskonzentration von 0.5 nmol mg Zellprotein^{-1} überschritten. Bei der gemessenen Aufnahme kann es sich jedoch nicht um eine durch die Lactose-Permease katalysierte Substrataufnahme handeln; im Stamm DP90CNal ist das lac-Operon deletiert (s. 2.2.1.). Somit läßt sich auch die Aufnahme von Lactose nicht durch Np∝Gal hemmen. Die Kinetik der Lactose-Aufnahme ähnelt dabei der für den Y^--Stamm T184 bestimmten Kinetik (s. 3.2.6., Abb. 14 und 15).

Der F'Y^{59}-Stamm T34UW verhält sich wie der Hintergrundstamm DP90CNal; auch er zeigt eine rasche Aufnahme von Lactose, die durch Np∝Gal nicht hemmbar ist (Abb. 29). Obwohl der Stamm T34UW nur eine Kopie des Y^{59}-Gens auf dem Episom trägt, läßt sich nach Korrektur um die Aufnahme im Stamm DP90CNal eine Transportaktivität angeben, die weniger als 0.4 % der Aktivität des Wildtypstammes T32UW beträgt (Tab. 16). Dies bestätigt das mit dem Stamm T213 erhaltene Ergebnis (s. 3.2.6.).

Korrigiert man die Lactose-Aufnahme in den Stämmen T32UW und T35UW ebenfalls um die Aufnahme von Lactose in dem Stamm DP90CNal, so lassen sich die in Tab. 16 gezeigten Geschwindigkeiten für den Lactose-Transport angeben.

Stamm	v	%	Akkumulation
DP90CNal	<0.005		
T32UW	9.9	100	62
T35UW	7.0	71	60
T34UW	<0.04	<0.4	

Tab. 16: Geschwindigkeit des Lactose-Transports (v in nmol min^{-1} mg Zellprotein^{-1}) in Zellen der Stämme DP90CNal, T32UW, T34UW und T35UW

Auch wenn die Transportaktivität des Stammes T35UW ca. 30 % unter der Aktivität des Wildtyps T32UW liegt, so zeigt die Revertante nicht nur phänotypisch, sondern auch hinsichtlich des Transports von Lactose Wildtypeigenschaften.

3.3.4. Isolierung einer Reversion vom Stamm T23UW

Wie die Analyse der Reversionsfrequenz der Y^{59}-Mutation gezeigt hat, genügt ein Basenaustausch, um wieder zurück zum Wildtypphänotyp zu gelangen.

Somit ist nur eine der drei Basensubstitutionen bzw. Mutationen im 5'-Ende des Y^{59}-Gens für die Eigenschaften der Y^{59}-Lactose-Permease verantwortlich. Um diese Mutation zu bestimmen, wurde vom Stamm T23UW, der das Plasmid pTE 18/59 trägt, eine Lac^+-Reversion isoliert.

Eine ÜK des Stammes T23UW in NBA-Tet-Medium wurde auf Minimal-Lactose-Thr-Met-Tet-Platten plattiert. Die nach 48 h auftretenden Revertanten wurden zweimal auf Minimal-Lactose-Platten gereinigt.

Da in Revertanten, die von Plasmidstämmen ausgehend, isoliert werden, neben dem revertierten Gen auch noch nicht-revertierte Gene vorliegen, wurde versucht, durch Transformation mit limitierenden Plasmid-DNA-Mengen eine Trennung des revertierten Gens von den nicht-revertierten Genen zu erreichen. Dazu wurde von einer Revertante des Stammes T23UW nach 2.2.2.12. die Plasmid-DNA isoliert und die DNA in entsprechenden Verdünnungen in den Stamm T215 transformiert.

Transformationsansatz	Verdünnung	Anzahl der Transformanten
a	1 : 10	93
b	1 : 100	8
c	1 : 500	2
d	1 : 1000	-

Die Transformanten der Ansätze b) und c) wurden auf ihren Phänotyp getestet; auf EMB-Lactose-Platten prägten alle Klone einen Lac^+-Phänotyp aus. Zur Bestimmung der DNA-Sequenz des 5'-Ende des revertierten Y^{59}-Gens (Y^{59R}-Gen bzw. Reversionsplasmid pTE 18/59R) wurde von einem Klon aus Ansatz c) (Bezeichnung: T36UW) die Plasmid-DNA nach 2.2.2.11. isoliert.

3.3.5. DNA-Sequenz des 5'-Endes des Y^{59R}-Gens

Die Bestimmung der DNA-Sequenz des 5'-Endes des Y^{59R}-Gens auf dem Reversionsplasmid pTE 18/59R erfolgte analog zur Sequenz-Bestimmung der Y^{59}-Mutation (s. 3.3.2.).

Wie aus Abb. 32 zu entnehmen ist, zeigt die Sequenz im Vergleich zur Sequenz des Wildtyps bzw. der Y^{59}-Mutante folgende Basenveränderungen:

	Y^{59R}	Y^{59}	Y^+
Codon 7 :	ATA	ATA	ACA
Codon 11 :	ATA	ATA	ATG
Codon 24 :	GGA	AGA	GGA

Nur in Codon 24 kommt es durch den Austausch von A → G (Transition) zu einer Basenveränderung. Damit kodiert das Codon 24 wie im Wildtypgen für die Aminosäure Glycin. Somit scheint für die Eigenschaften der Y^{59}-Lactose-Permease die G → A-Transition in Codon 24 verantwortlich zu sein. Unverändert sind im Y^{59R}-Gen im Vergleich zum Y^{59}-Gen das Codon 7 und 11; hier handelt es sich um stumme Mutationen, die anscheinend keinen Beitrag zum Y^{59}-Phänotyp liefern.

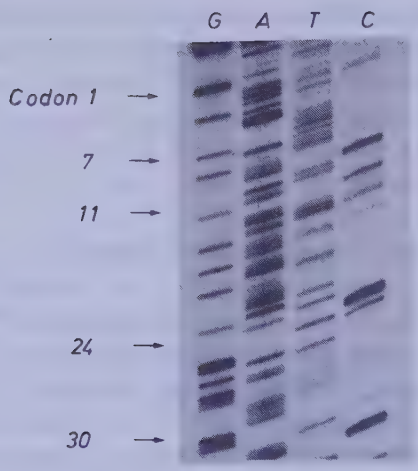


Abb. 32: Autoradiographie eines Sequenzgels
Gezeigt ist der Bereich von Codon 1 bis Codon 30 des Y^{59R}-Gens; die übrige DNA-Sequenz bis Codon 70 entspricht der Wildtypsequenz.
Die DNA-Sequenz, komplementär zur Sequenz, die man vom Sequenzgel ablesen kann, lautet:

1
ATG TAC TAT TTA AAA AAC ATA AAC TTT TGG

11
ATA TTC GGT TTA TTC TTT TTC TTT TAC TTT

21
TTT ATC ATG GGA GCC TAC TTC CCG TTT TTC

3.3.6. Charakterisierung der Revertante T36UW

Der Stamm T36UW sollte dem Wildtyp entsprechende kinetische Eigenschaften haben, wenn die Mutationen in Codon 7 und 11 des Y^{59}- und des Y^{59R}-Gens für den Y^{59}-Phänotyp bzw. für den Wildtypphänotyp unbedeutend sind.

Wie der Tab. 17 zu entnehmen ist, zeigt der Stamm T36UW hinsichtlich Bindung und Transport von Substrat Wildtypeigenschaften.

Substrat	K_D	K_T	V_{max}
Npα Gal	21		
GalSGal	77		
Lactose	7400		
NpßGal		1	2.4

Tab. 17: Charakterisierung der Revertante T36UW
Die Bestimmung der K_D-Werte (µM) erfolgte wie in 3.2.1. beschrieben ($K_D^{Lactose}$ wurde mit Membranen des Stammes T37UW bestimmt); Transport (K_T in mM, V_{max} in µmol min^{-1} mg Zellprotein^{-1}) wurde über die Hydrolyse von NpßGal (0.2 - 3.0 mM) gemessen

3.4. Versuche zum Nachweis eines negativen dominanten Effekts der Y^{59}- und der $Y^{-d}3$-Mutation auf das Y^{+}-Gen

Für die Funktionsweise der Lactose Permease wurde aufgrund kinetischer (48) und genetischer (27) Untersuchungen eine dimere (oligomere) Struktur der Lactose-Permease vorgeschlagen.

Aus der Existenz sog. negativ-dominanter Y^{-d}-Mutanten, die nach der in (27) gegebenen Definition weder Galactoside noch Protonen binden und transportieren, kann man folgern, daß

in einer dimeren Lactose-Permease die Untereinheiten miteinander wechselwirken. Der Ersatz einer Untereinheit durch ein funktionsloses (Y^{-d}-)Monomer sollte daher das Dimer inaktivieren. Eine diploide Heterogenote, also eine Zelle, die neben dem Wildtypen auch ein Y^{-d}-Gen trägt, sollte demnach gegenüber der homogenoten Zelle (nur Wildtypen) eine erniedrigte Bindungs- und Transportaktivität zeigen.

Es wurde versucht, einen solchen negativen Dominanzeffekt sowohl für die Y^{59}-Mutation als auch für eine der in (27) beschriebenen Y^{-d}-Mutationen nachzuweisen.

3.4.1. Versuche zum Nachweis eines negativen Dominanzeffekts der Y^{59}-Mutation

Stämme, die neben einer Y^{+}-Genkopie (auf dem Chromosom oder auf einem F'-Faktor) das rekombinante Plasmid mit dem Y^{59}-Gen enthalten, sollten, wenn die Y^{59}-Mutation über das Y^{+}-Gen negativ-dominant ist, eine erniedrigte Bindungs- und Transportaktivität zeigen.

Als Hintergrundstamm für diese Komplementationsversuche wurde der Stamm T27RT verwendet, der auch chromosomaler Hintergrund des Stammes T215 ist (der Stamm T215 ist hinsichtlich Bindung und Transport von Substrat Lactose-Permease negativ, s. 3.2.2. und 3.2.4.).

Der Stamm T27RT wurde mit dem Wildtypstamm X90 (s. 2.2.1.) gekreuzt und das Kreuzungsprodukt, der Stamm T24UW, mit dem Mutantenplasmid pGM 21/59 transformiert (Bezeichnung der Transformante: T25UW).

Der Stamm T25UW prägt dabei wie der Stamm T24UW (Wildtyp) auf EMB-Lactose-Platten einen Lac^{+}-Phänotyp aus; somit läßt sich phänotypisch kein negativer Dominanzeffekt der Y^{59}-Mutation feststellen. Auch kinetisch läßt sich ein solcher Effekt, wie aus Tab. 18 zu ersehen ist, nicht nachweisen.

Stamm	Transport				Bindung	ß-Galactosidase	
	GalSGal	%	NpßGal	%	Npα Gal		%
T24UW	7	100	0.04	100	0.11	5.9	100
T25UW	5	71	0.03	75	0.66	4.4	75

Tab. 18: Bindung und Transport in den Stämmen T24UW und T25UW. Transport von GalSGal (10 µM, in nmol min^{-1} mg Zellprotein^{-1}) und NpßGal (2 mM, in µmol min^{-1} mg Zellprotein^{-1}) wurde in Zellen gemessen; die Bindung von Npα Gal (in nmol mg Zellmembranprotein^{-1}) wurde mittels Flußdialyse in Zellmembranen bestimmt mit 10 µM Npα Gal für T24UW und 2.8 µM Npα Gal für T25UW; ß-Galactosidase-Aktivität in µmol min^{-1} mg Zellprotein^{-1}

Zwar zeigt der Stamm T25UW eine ca. 30 % geringere Transportaktivität im Vergleich zum Stamm T24UW; die Ursache für diesen Unterschied könnte aber in einer nicht vollständigen Induktion des Stammes T25UW liegen, da auch die ß-Galactosidase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp T24UW erniedrigt ist.

Npα Gal als Substrat wird dabei in Zellmembranen des Stammes T25UW mit einer 6 x höheren Aktivität gebunden als im Stamm T24UW. Bei der gegebenen Npα Gal-Konzentration von 2.8 µM erfaßt man dabei wegen der höheren Affinität der Y^{59}-Lactose-Permease zu Npα Gal (s. 3.2.1.) hauptsächlich die durch die Y^{59}-Lactose-Permease exprimierte Bindungsaktivität.

Vergleicht man die Aktivität der ß-Galactosidase mit der eines K12YMel-Wildtypstammes, so beträgt die für die Stämme T24UW und T25UW gemessene Aktivität 38 % bzw. nur 28 % der für einen K12YMel-Stamm meßbaren ß-Galactosidase-Aktivität im vollinduzierten Zustand (15.6 µmol min^{-1} mg Zellprotein^{-1}). Da dies auf eine nicht vollständige Induktion der Stämme T24UW und T25UW hindeutet, wurden die für diese Stämme durchgeführten Bindungs- und Transportmessungen mit den Stämmen T44RT und T28UW, der durch Transformation von T44RT mit pGM 21/59 erhalten wurde, wiederholt. In Tabelle 19 sind die ermittelten Daten dargestellt.

Stamm	Transport					Bindung	ß-Galactosidase
	GalSGal		NpßGal			NpαGal	
			V_{max}		K_T		
		%		%			
T44RT	17.7	100	0.24	100	0.74	0.17	12
T28UW	7.6	43	0.103	43	0.62	1.1	12

Tab. 19: Bindung und Transport in den Stämmen T44RT und T28UW. In Zellen wurde der Transport von GalSGal (nmol min^{-1} mg $Zellprotein^{-1}$) und NpßGal (0.2 - 3.0 mM, V_{max} in µmol min^{-1} mg $Zellprotein^{-1}$, K_T in mM) gemessen; durch Flußdialyse wurde die Bindung von NpαGal (nmol mg $Zellmembranprotein^{-1}$) an Zellmembranen bestimmt; ß-Galactosidase-Aktivität in µmol min^{-1} mg $Zellprotein^{-1}$; sonstige Bedingungen wie in Tab. 18 angegeben

Phänotypisch unterscheidet sich der Stamm T28UW nicht vom Wildtyp T44RT; auf EMB-Lactose-Platten wird ein Lac^+-Phänotyp ausgeprägt.

Die ß-Galactosidase-Aktivität ist, wie aus Tabelle 19 zu ersehen ist, in beiden Stämmen gleich; somit sind beide Stämme im gleichen Ausmaß induziert.

Wie für den Stamm T25UW, so wurde auch für den Stamm T28UW eine erniedrigte Transportaktivität für GalSGal und NpßGal als Substrate im Vergleich zum Kontrollstamm T44RT gefunden, die weniger als 50 % der Aktivität des Stammes T44RT beträgt. Das $K_T^{NpßGal}$ ist dabei in beiden Stämmen vergleichbar, während die Bindungsaktivität des Stammes T28UW wie im Stamm T25UW 6 x höher ist als im Stamm T44RT. Diese höhere Aktivität ist ebenfalls hauptsächlich auf die Bindungsaktivität der Y^{59}-Lactose-Permease im Stamm T28UW zurückzuführen.

Aufgrund der mit den heterogenoten (Y^+/Y^{59}) Stämmen T25UW und T28UW durchgeführten Messungen läßt sich für die Y^{59}-Lactose-Permease ein negativer Dominanzeffekt auf das Y^+-Gen nicht nachweisen.

Zwar zeigen beide Stämme eine erniedrigte Transportgeschwindigkeit für die Substrate GalSGal und NpßGal im Vergleich zu ihren homogenoten Kontrollen T24UW und T44RT. Jedoch ist die gemessene Transportaktivität in den heterogenoten Stämmen noch 5 - 7 x höher als die bei vorhandener negativer Dominanz zu erwartende Transportaktivität. Nimmt man nämlich an, daß in einer heterogenoten Zelle mit einer Y^+-Genkopie die Kopienzahl des Y^{59}-Gens durch das Plasmid pGM 21/59 um einen Faktor 10 höher ist, so sollten mehr als 90 % aller Permease-Dimeren als Y^+/Y^{59}-Heterodimere vorliegen. Da die Untereinheiten miteinander wechselwirken, sollte die Transportgeschwindigkeit weniger als 10 % der Geschwindigkeit in dem entsprechenden homogenoten Stamm (nur Y^+-Gen) betragen.

3.4.2. Versuche zum Nachweis eines negativen Dominanzeffekts der $Y^{-d}3$-Mutation

Die in (27) beschriebene phänotypisch negativ-dominante $Y^{-d}3$-Mutation wurde in den Stämmen HB3 und 71-56-10 $pY^{-d}3$ auf ihren negativen Dominanzeffekt getestet. Als Kontrollstämme dienten die Stämme HB1, HB2 sowie der Stamm 71-56-10 (s. 2.2.1.).

3.4.2.1. Phänotypische Charakterisierung der Stämme HB3 und 71-56-10 $pY^{-d}3$

Zur phänotypischen Charakterisierung der $Y^{-d}3$-Mutanten wurden ÜK in 1 ml NBA-Medium auf geeignete Platten getropft (ca. 30 µl). Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C; alle 6 h wurde dabei das Wachstum kontrolliert.

Stamm	Platten		
	EMB-Lactose	Minimal-Glucose	Minimal-Lactose
HB1	+ (≥ 12 h)	+ (≥ 12 h)	+ (≥ 12 h)
HB2	+ (")	+ (")	+ (")
HB3	+ (")	+ (")	+ (")
71-56-10	+ (≥ 16 h)	+ (≥ 20 h)	+ (≥ 36 h)
71-56-10/ $pY^{-d}3$	+ (≥ 36 h)	+ (≥ 48 h)	- (")

Das Wachstum auf Platten zeigt, daß HB3 im Vergleich zu HB1 keinen negativen dominanten Effekt zeigt, da nach gleichlanger Inkubation auf EMB-Lactose-Platten ein Lac^+-Phänotyp zu beobachten ist. Das Wachstum auf Minimal-Glucose-Platten ist in allen drei Stämmen vergleichbar. Auf Minimal-Lactose-Platten zeigt sich ein etwas verzögertes Wachstum von HB3 im Vergleich zu HB1, wobei allerdings HB2 trotz rekombinanten Wildtypplasmid pHB Y^+ ebenfalls schlechter wächst als HB1.

Der Stamm 71-56-10 $pY^{-d}3$ zeigt im Vergleich zu seiner Kontrolle sehr schlechtes Wachstum auf Minimal-Glucose-Platten. Beide Stämme prägen auf EMB-Lactose-Platten einen Lac^+-Phänotyp aus. Das negative Wachstum des Stammes 71-56-10 $pY^{-d}3$ auf Minimal-Lactose-Platten könnte, da die Kontrolle nach mehr als 36 h Inkubation positiv ist, auf einen negativen Dominanzeffekt hindeuten, der sich auch kinetisch nachweisen lassen sollte.

3.4.2.2. Bindung und Transport in den Stämmen HB3 und 71-56-10 $pY^{-d}3$

Sowohl durch Bestimmung der Bindungsaktivität mit Npα Gal als Substrat als auch durch Bestimmung der Geschwindigkeit des Transports der Substrate GalSGal und NpßGal erfolgte die ki-

netische Charakterisierung der $Y^{-d}3$-Mutantenstämme HB3 und 71-56-10 $pY^{-d}3$.

In Tabelle 20 sind die für die $Y^{-d}3$-Stämme und ihre Kontrollstämme bestimmten Daten zusammengefaßt.

Stamm	Transport				Bindung	ß-Galactosidase
	GalSGal		NpßGal		NpGal	
		%		%		
HB1	1.63	100	0.05	100	<0.05	4.1
HB2	1.78	109	0.12	240	"	4.1
HB3	1.73	106	0.08	168	"	7.5
71-56-10	0.96	100	0.035	100	"	0.096
71-56-10/$pY^{-d}3$	0.93	97	0.035	100	"	0.112

Tab. 20: Kinetische Charakterisierung der $Y^{-d}3$-Mutantenstämme HB3 und 71-56-10 $pY^{-d}3$.
Die Anzucht der Stämme erfolgte in NBA-Medium, induziert wurde mit 5 x 10^{-4}M PrSGal. Transport von GalSGal (10 µM, in nmol min^{-1} mg $Zellprotein^{-1}$) und NpßGal (2 mM, in µmol min^{-1} mg $Zellprotein^{-1}$) wurde in Zellen bestimmt; Bindung von Np«Gal (10 µM, in nmol mg $Zellmembranprotein^{-1}$) wurde mittels Flußdialyse in Zellmembranen gemessen; ß-Galactosidase-Aktivität in µmol min^{-1} mg $Zellprotein^{-1}$

Alle fünf Stämme zeigen in der Flußdialyse keine nachweisbare Np«Gal-Bindung, was insbesondere für den Stamm HB2 erstaunlich ist, da dieser Stamm das Wildtypplasmid $pHBY^{+}$ trägt und somit als Lactose-Permease-Überproduzent (vergleichbar mit dem Stamm T217) gelten sollte (das Plasmid $pHBY^{+}$ ist dabei völlig verschieden von den in (58) beschriebenen Wildtypplasmiden pGM 21 und pTE 18).

Vergleicht man die Geschwindigkeiten, mit denen das Substrat NpßGal in den Stämmen HB1, HB2 und HB3 transportiert wird, miteinander, so läßt sich kein negativer dominanter Effekt der $Y^{-d}3$-Mutation feststellen; die Transportgeschwindigkeit ist in dem $Y^{+}/Y^{-d}3$-Stamm HB3 entgegen der Erwartung deutlich höher als im Kontrollstamm HB1. Im Stamm 71-56-10 $pY^{-d}3$ ist dabei die NpßGal-Transportaktivität gleich der in der Kontrolle 71-56-10.

Die GalSGal-Transportrate zeigt ebenfalls, daß die $Y^{-d}3$-Mutation weder im Stamm HB3 noch im Stamm 71-56-10 $pY^{-d}3$ die Aktivität des Y^{+}-Gens erniedrigen kann.

Somit läßt sich aufgrund dieser Messungen weder phänotypisch (s. 3.4.2.1.) noch kinetisch ein negativer Dominanzeffekt der $Y^{-d}3$-Mutation feststellen.

Ursache hierfür könnte allerdings in der geringen Expression der entsprechenden Gene liegen. Bezieht man nämlich die in Tabelle 20 angegebenen Aktivitäten der ß-Galactosidase auf die eines K12YMel-Wildtypstammes (100 % = 15.6 µmol min^{-1} mg $Zellprotein^{-1}$), so beträgt die ß-Galactosidase-Aktivität im Stamm HB1 und HB2 nur 28 %, im Stamm HB3 48 % und in den Stämmen 71-56-10 bzw. 71-56-10 $pY^{-d}3$ nur 0.62 % bzw. 0.72 % der Aktivität im K12YMel-Stamm.

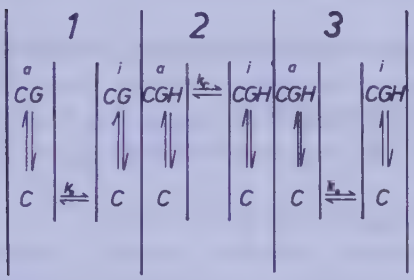
3.5. Versuche zur Identifizierung des defekten Translokationsschrittes der Y^{59}-Lactose-Permease

Geht man von dem allgemeinen Transportscheme des ß-Galactosidtransports durch die Lactose-Permease aus (s. Einleitung), dann sollten sich die charakteristischen Eigenschaften der Y^{59}-Lactose-Permease, nämlich Bindung von Substrat, aber nur sehr geringer Transport von Substrat, durch einen (oder mehrere) Defekt (e) im Translokationszyklus erklären lassen.

Prinzipiell kann man sich drei Grenzfälle vorstellen, die zu einer Störung im Transportzyklus führen:

1) keine H^+-Bindung
2) kein k_o-Schritt
3) kein k_c-Schritt

Jede dieser drei Störungen im Translokationsvorgang führt zu bestimmten kinetischen Eigenschaften (Abb. 33).



			kinetische Eigenschaften
-	-	-	aktiver Transport
-	-	-	erleichterte Diffusion
-	+	-	Austausch
+	+	+	Erfassung aller Bindungsstellen in Zellen
-	+	-	Bindung an mit Substrat beladenen Zellen

Abb. 33: Schematische Darstellung der drei möglichen Grenzfälle 1 - 3; das Zeichen "+" bedeutet dabei, daß die jeweilige Eigenschaft meßbar ist, während ein "-" bedeutet, daß diese Eigenschaft nicht meßbar ist

Kann der Träger kein Proton mehr binden, kann sich der ternäre Komplex "CHG" nicht bilden. Aktiver Transport, erleichterte Diffusion oder Austausch kann durch den Träger dann nicht mehr katalysiert werden. Bindung von Substrat ist dagegen möglich, wobei in Zellen alle Bindungsstellen erfaßt werden, wenn man eine Ausrichtung der Bindungsstellen in Zellen zum Periplasma voraussetzt.

Ist der k_o-Schritt, also die Bewegung des unbeladenen Trägers blockiert, so ist aktiver Transport und erleichterte Diffusion nicht möglich. Austausch dagegen als katalytischer Vorgang kann stattfinden. Unter der Annahme, daß in Zellen alle Bindungsstellen zum periplasmatischen Raum ausgerichtet sind, lassen sich sämtliche Bindungsstellen erfassen. Mit dieser Annahme ist auch ein einmaliger Umorientierungsschritt der Trägermoleküle von außen nach innen möglich.

Ist schließlich die Bewegung des beladenen Trägers nicht möglich (k_c-Schritt defekt), so kann man weder aktiven Transport noch erleichterte Diffusion noch Austausch messen. Sämtliche Bindungsstellen sind dabei in Zellen von außen zugänglich.

Würde man Zellen, die einen dieser Defekte aufweisen, mit Substrat (sättigende Konzentration) beladen, so wäre, vorausgesetzt, daß kein nennenswerter Ausstrom von Substrat aus den beladenen Zellen stattfindet, keine Substratbindung von außen möglich, wenn die H^+-Bindung oder der k_c-Schritt defekt ist, da sämtliche Trägermoleküle bzw. deren Bindungsstellen durch die hohe innere Substratkonzentration zur cytoplasmatischen Seite fixiert werden. Ist dagegen der k_o-Schritt defekt, so kann man von außen Bindung von Substrat messen; man mißt dabei eigentlich eine Überlagerung von Bindung und Austausch.

Es wurde versucht, über Bindungsmessungen an mit Substrat beladenen bzw. unbeladenen Zellen und inside-out-Vesikeln (ISO-Vesikeln) den in der Y^{59}-Lactose-Permease vorliegenden Defekt zu erfassen.

3.5.1. NpαGal-Bindung an Zellen

Die Bindung von NpαGal wurde an Zellen des Stammes T219 durch Flußdialyse bestimmt; als Kontrolle wurden Zellen des Stammes T217 verwendet.

Die Freisetzung von Substrat, also Hemmung der Bindung, erfolgte durch das SH-Reagenz Hg-UTP. Wegen der Größe des Reagenz wurden die Zellen der Stämme T219 und T217 mit EDTA behandelt, wodurch eine erhöhte Permeabilität der äußeren Membran erreicht wird, so daß das Reagenz Hg-UTP an die cytoplasmatische Membran gelangen kann. Die Cytoplasmamembran soll dabei impermeabel für Hg-UTP sein, während das SH-Reagenz $ClHgBzSO_3$ über die cytoplasmatische Membran permeieren kann.

In Tabelle 21 sind die erhaltenen Ergebnisse dargestellt.

Stamm	Substratfreisetzung		Bindung
	Hg-UTP	$ClHgBzSO_3$	
T217	+	-	1.26
T219	+	-	0.65
T219 (beladen mit GalSGal)	+	-	0.35

Tab. 21: Bindung von NpαGal (nmol mg Zellprotein^{-1}) an nach 2.2.2.5. präparierten EDTA-Zellen der Stämme T217 und T219; weitere Behandlung der Zellen wie in 2.2.2.10. beschrieben. Nach Beladen mit GalSGal (1 mM) wurden die Zellen dreimal mit 5 ml KP_i-Puffer gewaschen (5 min bei 8 000 Upm, 4°C) und in 1 ml KP_i-Puffer resuspendiert; Hemmung der Bindung durch Zugabe von Hg-UTP (0.25 mM) und nach 6 weiteren Fraktionen durch $ClHgBzSO_3$ (0.4 mM), wobei ein "+" Freisetzung von Substrat bedeutet (innerhalb von 2 min), und ein "-" keine weitere Substratfreisetzung

Wie aus Tabelle 21 zu ersehen ist, führt Hg-UTP in EDTA-Zellen des Wildtyps T217 zu einer vollständigen Freisetzung des gebundenen Substrats, da durch $ClHgBzSO_3$ keine weitere Substratfreisetzung erfolgt. Somit erfaßt man auch in den EDTA-Zellen des Stammes T219 sämtliche Bindungsstellen. In Zellen

scheinen die Lactose-Permease-Moleküle demnach so ausgerichtet zu sein, daß alle Bindungsstellen vom periplasmatischen Raum her zugänglich sind.

In mit GalSGal beladenen EDTA-Zellen des Stammes T219 läßt sich ebenfalls mit Hg-UTP die Bindung von [6-^{3}H]NpαGal vollständig aufheben, da $ClHgBzSO_3$ keine weitere Substratfreisetzung bewirkt. Allerdings beträgt die Bindungsaktivität nur ca. 50 % der Aktivität, die für die unbeladenen Zellen des Stammes T219 ermittelt wurde. Es scheint demnach so, als ob sich bei der Beladung mit GalSGal ca. 50 % der Permease-Moleküle von außen ins Zellinnere umorientiert haben, so daß man nur die Bindungsstellen erfaßt, die noch vom periplasmatischen Raum her zugänglich sind.

3.5.2. NpαGal-Bindung an ISO-Vesikel

Die Präparation der ISO-Vesikel erfolgte aus Zellen des Stammes T213 durch Aufschluß der Zellen in einer French-Presse (in ISO-Vesikeln ist dabei die in Zellen dem Periplasma zugewandte Membranseite dem Vesikelinneren zugewandt).

Durch Zugabe von Hg-UTP, GalSGal und NpαGal wurde das markierte NpαGal verdrängt, wobei die Vollständigkeit der Substratfreisetzung wie in 3.5.1. mit dem Reagenz $ClHgBzSO_3$ überprüft wurde (Tabelle 22).

	Substratfreisetzung					
	Hg-UTP/ $ClHgBzSO_3$	n	GalSGal/ $ClHgBzSO_3$	n	Np∝Gal/ $ClHgBzSO_3$	n
ISO-Vesikel (unbeladen)	-/+	0.63	+/-	0.88	+/-	0.92
ISO-Vesikel (mit GalSGal beladen)	-/+	0.24	+/-	0.29	+/-	0.34

Tab. 22: Bindung von Np∝Gal (2.8 µM, n in nmol mg Membranprotein^{-1}) an ISO-Vesikel aus Zellen des Stammes T213. Die Präparation der mit GalSGal beladenen ISO-Vesikel erfolgte durch Aufschluß der Zellen in KP_i-Puffer incl. 5 mM GalSGal (Vesikel 1 x in KP_i-Puffer gewaschen). Durch Hg-UTP (0.25 mM), GalSGal (1 mM), Np∝Gal (0.5 mM) sowie durch Zugabe von $ClHgBzSO_3$ (0.4 mM) nach 6 weiteren Fraktionen erfolgte Hemmung der Bindung. Wie in Tab. 21 bedeutet "+" Freisetzung von $[6-^3H]$ Np∝Gal, während "-" keine weitere Substratfreisetzung bedeutet.

Wie aus Tabelle 22 zu ersehen ist, kann durch einen Überschuß von GalSGal bzw. unmarkiertem Np∝Gal die Bindung von Np∝Gal sowohl in mit GalSGal beladenen als auch in unbeladenen ISO-Vesikeln vollständig aufgehoben werden, da nach Zugabe von $ClHgBzSO_3$ keine weitere Substratfreisetzung mehr feststellbar ist.

Hg-UTP dagegen bewirkt keine Substratfreisetzung, unabhängig davon, ob die Vesikel mit Substrat beladen sind oder nicht. Erst durch Zugabe von $ClHgBzSO_3$ wird das gebundene Np∝Gal freigesetzt.

Die für die unbeladenen ISO-Vesikeln bestimmten Bindungsaktivitäten sind dabei annähernd gleich, ebenso die an die beladenen Vesikel bestimmten Bindungswerte.

Jedoch wird von den mit GalSGal beladenen ISO-Vesikeln weniger Substrat gebunden als von den unbeladenen Vesikeln; die Bindungsaktivitäten sind ca. einen Faktor 3 geringer als die der unbeladenen ISO-Vesikel. Dies wurde auch in den Versuchen mit Zellen gefunden (s. Tab. 21).

3.5.3. Interpretation der in 3.5.1. und 3.5.2. dargestellten Ergebnisse

Die kinetische Charakterisierung der Y^{59}-Lactose-Permease hat gezeigt, daß die Y^{59}-Lactose-Permease keinen aktiven Transport von Substrat katalysiert (s. 3.2.3. - 3.2.7.). Erleichterte Diffusion findet im Vergleich zum Wildtyp stark verlangsamt statt, während Austausch nicht zu beobachten ist (P. Overath, persönl. Mitteilung).

In Zellen erfaßt man mit dem Substrat NpαGal sämtliche Bindungsstellen (s. Tab. 21). Somit könnte ein defekter k_c-Schritt oder ein Defekt in der H^+-Bindung die Eigenschaften der Y^{59}-Lactose-Permease erklären (s. Abb. 33). Da der k_o-Schritt, also die Bewegung des unbeladenen Trägers, noch möglich ist, kann man an ISO-Vesikel Bindung von NpαGal messen, wie aus Tabelle 22 zu ersehen ist. Durch einen Überschuß an NpαGal bzw. GalSGal läßt sich das gebundene markierte NpαGal verdrängen; wie in Zellen erfaßt man dabei sämtliche Bindungsstellen.

Der Effekt von Hg-UTP dagegen scheint auf einen defekten k_o-Schritt hinzudeuten (s. Tab. 22). Unter der Annahme, daß die Durchlässigkeit der ISO-Vesikel gering ist, sollte, wenn der k_o-Schritt ausgefallen ist, keine Bindung von Substrat möglich sein, da alle Bindungsstellen in das Vesikelinnere gerichtet sind. Da Hg-UTP keine Substratfreisetzung bewirkt, scheint somit auch kein NpαGal gebunden zu sein. Durch einen Überschuß an unmarkiertem NpαGal bzw. durch GalSGal oder durch $ClHgBzSO_3$ kommt es jedoch zur Substratfreisetzung. Diese Beobachtung könnte man aber mit einer erhöhten passiven

Permeabilität der ISO-Vesikel für Np∝Gal, GalSGal und $ClHgBzSO_3$ erklären. Aufgrund dieser Durchlässigkeit kann Np∝Gal an die in das Vesikelinnere gerichteten Bindungsstellen binden und durch GalSGal bzw. Np∝Gal bzw. $ClHgBzSO_3$ verdrängt werden, während Hg-UTP trotz dieser erhöhten Durchlässigkeit nicht in das Vesikelinnere gelangen kann (vielleicht wegen seiner Größe und seiner Ladung).

Auch an mit GalSGal beladenen ISO-Vesikeln scheint Np∝Gal nicht zu binden, da durch Hg-UTP keine Substratfreisetzung erfolgt. Eine Erklärung hierfür wäre, daß durch die im Inneren der Vesikel herrschende GalSGal-Konzentration sämtliche Bindungsstellen ins Vesikelinnere gerichtet sind. Dies würde auf einen Defekt in der H^+-Bindung oder im k_c-Schritt hindeuten. Im Widerspruch dazu stehen allerdings die Beobachtungen, daß nach Zugabe von $ClHgBzSO_3$ bzw. GalSGal bzw. Np∝Gal gebundenes $[6\text{-}^3H]$ Np∝Gal freigesetzt wird, was auf einen Defekt des k_o-Schrittes hindeuten würde.

Entsprechend könnte man die Tatsache, daß an mit GalSGal beladenen Zellen durch Hg-UTP die Bindung von Np∝Gal aufhebbar ist, deuten. Wie für die ISO-Vesikel gefunden wurde, so ist die Bindungsaktivität auch um einen Faktor 2 geringer als die der unbeladenen Zellen.

Die um ca. 50 % niedrigere Bindungsaktivität ließe sich aber auch durch einen Ausfall der H^+-Bindung bzw. durch einen Ausfall des k_c-Schrittes erklären. Denn die in Abb. 33 dargestellten Grenzfälle und deren Eigenschaften lassen sich nur dann feststellen, wenn der entsprechende Schritt zu 100 % ausgefallen ist; das erhaltene Ergebnis zeigt die richtige Tendenz, wenn man einen nicht vollständigen Defekt im k_c-Schritt bzw. in der H^+-Bindung annimmt.

Aufgrund der durchgeführten Messungen lassen sich die Eigenschaften der Y^{59}-Lactose-Permease weder durch eine fehlende Protonen-Bindung noch durch einen defekten k_o-Schritt bzw. defekten k_c-Schritt eindeutig erklären.

Eine eindeutige Klärung, welche Translokationsschritte verändert oder blockiert sind, wäre vielleicht möglich, wenn man die genaue Orientierung der Permease-Moleküle in Zellen und Vesikeln bestimmen könnte, und wenn über die Permeabilitätseigenschaften von SH-Reagenzien in Zellen und Vesikeln genaueres bekannt wäre.

4. Diskussion

Bakterien haben eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, um Metabolite wie Aminosäuren und Zucker aufzunehmen.

Prinzipiell läßt sich der Transport eines niedermolekularen Substrats über die cytoplasmatische Membran durch ein membrangebundenes Transportprotein durch vier Schritte beschreiben. Zuerst bindet das Substrat an die von einer Seite der Membran zugänglichen Bindungsstelle im Protein. Danach kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins dergestalt, daß die Bindungsstelle zur anderen Seite der Membran gerichtet ist. Als dritter Schritt dissoziiert das Substrat ab und schließlich orientiert sich das Transportprotein durch eine weitere Konformationsänderung in seine ursprüngliche Lage um.

Eines der am besten untersuchten Transportsysteme ist der Transport von Lactose und anderen ß-Galactosiden über die Cytoplasmamembran durch die Lactose-Permease von E.coli.

Um den molekularen Mechanismus des Translokationszyklus der Lactose-Permease aufzuklären, wurde versucht, durch Mutation einzelne Schritte im Translokationsvorgang zu verändern.

Nach Mutagenese des Plasmids pTE 18, welches ein funktionelles Y^+-Gen trägt (59), wurde eine Mutante isoliert, die verschiedene Substrate binden, aber nicht mehr transportieren kann.

Die kinetischen Eigenschaften dieser Mutante bzw. des mutierten Lactose-Trägers (Y^{59}-Lactose-Permease) sind in Tabelle 23 zusammengefaßt.

	Y^+	Y^{59}	Y^-
Bindung			
NpαGal			
Anzahl der Bindungsstellen (nmol mg Zellmembranprotein^{-1})	1.21	1.20	<0.05
K_D (µM)	22	4.6	
GalSGal			
K_D (µM)	53	40	
Lactose			
K_D (µM)	14 000	625	
Transport			
NpßGal	100 %	<0.4 %	<0.4 %
GalSGal	100 %	<0.05 %	<0.001 %
K_T (µM)	72	37	
k_{cat} (s^{-1})	66	0.002	
Lactose	100 %	<0.4 %	<0.4 %
NpαGal	100 %	<0.4 %	<0.4 %
Efflux			
GalSGal			
$t_{1/2}$ (min)	≪0.5	64 (>100)	56 (>100)
Lactose			
$t_{1/2}$ (min)	0.08	>2	>2
NpαGal			
$t_{1/2}$ (min)	0.9	1.6	3.3

Tab. 23: Zusammenfassung der kinetischen Daten aus 3.2.1. - 3.2.8.
Y^+ steht für die Wildtypstämme T217 und T206, Y^{59} für die Mutantenstämme T219 und T213 und Y^- für die Stämme T215 und T184 (s. 2.2.1.).

Bindung und Transport von Substraten durch die Y^{59}-Lactose-Permease.

Der Transport von Substrat über die Cytoplasmamembran setzt eine spezifische Wechselwirkung zwischen der Lactose-Permease und dem Substrat voraus. Diese Wechselwirkung läßt sich durch die Dissoziationskonstante K_D beschreiben, die für jedes Substrat der Lactose-Permease eine charakteristische Größe hat.

Die für die Substrate Np∝Gal, GalSGal und Lactose bestimmten K_D-Werte zeigen, daß der mutierte Lactose-Träger eine deutlich höhere Affinität zu Lactose und Np∝Gal besitzt als die Wildtyppermease. Lactose wird von der Y^{59}-Lactose-Permease mit einer ca. 22 x höheren Affinität gebunden, Np∝Gal mit einer ca. 5 x höheren Affinität, während das Substrat GalSGal mit einer dem Wildtyp entsprechenden Affinität gebunden wird. Wie für den Wildtyp, so ist auch für die Y^{59}-Lactose-Permease die Affinität zu Np∝Gal>GalSGal>Lactose.

Die Expression des Y^{59}-Gens durch die Plasmide pTE 18/59 bzw. pGM 21/59 entspricht dabei der Expression des Y^{+}-Gens durch die Plasmide pTE 18 bzw. pGM 21. Im Vergleich zu einer Y^{59}- oder Y^{+}-Genkopie auf einem Episom oder dem Chromosom wird durch die Mutanten- und Wildtypplasmide die Menge an Y^{59}- bzw. Y^{+}-Lactose-Permease in der Cytoplasmamembran um einen Faktor 8 erhöht (s. 3.2.2., Tab. 3 und 3.3.1., Tab. 12), was den in (59) beschriebenen Ergebnissen entspricht.

Die Transportaktivität der Y^{59}-Lactose-Permease ist, wie aus Tabelle 23 zu ersehen ist, im Vergleich zur Wildtyppermease deutlich erniedrigt.

Für das Substrat GalSGal kann eine Transportgeschwindigkeit angegeben werden, die weniger als 0.05 % der Transportgeschwindigkeit der Wildtyppermease entspricht (s. 3.2.4. - 3.2.5.). Da der Hintergrundstamm T215 keine Aufnahme von GalSGal in das Zellinnere zeigt (s. 3.2.4., Abb. 8), läßt sich trotz dieser

geringen Transportaktivität die für das Substrat GalSGal charakteristische Transportkonstante K_T bestimmen, die dem K_D-Wert entspricht. Somit läßt sich wie für den Wildtyp auch für die Y^{59}-Lactose-Permease in Gegenwart von $\Delta\tilde{\mu}_H^+$ kein $K_D \rightarrow K_T$-Effekt nachweisen. Innerhalb eines Faktors von 2 entspricht das $K_T^{GalSGal}$ dem $K_T^{GalSGal}$ der Wildtyppermease.

Durch das affinere Substrat Npα Gal läßt sich die durch die Y^{59}-Lactose-Permease katalysierte GalSGal-Aufnahme vollständig hemmen (s. 3.2.4., Abb. 8), während im Wildtyp sowohl K_T als auch V_{max} verändert werden, was auf eine unvollständige Hemmung hindeutet bzw. zeigt, daß Npα Gal nicht rein kompetitiv hemmt (41).

Für die Substrate Npα Gal, NpßGal und Lactose konnte eine entsprechende kinetische Charakterisierung nicht durchgeführt werden, da die jeweiligen Y^--Stämme T215 und T184 für diese Substrate einen zu hohen Meßhintergrund zeigten.

Besonders bei der Bestimmung der Transportgeschwindigkeit mit Lactose als Substrat zeigte sich dieser hohe Meßhintergrund. Bestes Beispiel hierfür ist die Bestimmung der Geschwindigkeit der Lactose-Aufnahme in Zellen des Stammes DP90CNal (s. 3.3.3.1., Abb. 28).

Bei der gemessenen Aufnahme kann es sich nicht um einen durch die Lactose-Permease katalysierten Lactose-Transport handeln, da auf dem Chromosom des Stammes DP90CNal das lac-Operon deletiert ist. Somit läßt sich die Aufnahme von Lactose auch nicht durch das affinere Substrat Npα Gal hemmen.

Eine mögliche Erklärung für diese Lactose-Aufnahme wäre, daß es in Zellen ein zweites, konstitutives Lactose-Transportsystem gibt. Möglich wäre auch, daß die gemessene Aufnahme nicht einer Aufnahme von Lactose, sondern von Galactose entspricht, da [6-^{3}H] Lactose in ^{3}H-Galactose und in Glucose hydrolysieren kann. Durch Reinigung der markierten Lactose-Lösung über Säulen-

chromatographie sollte es gelingen, eventuell durch Hydrolyse von Lactose entstandene Galactose abzutrennen. Die Aufnahme-Kinetik sollte dann der von GalSGal in Zellen des Stammes T215 entsprechen (s. 3.2.4., Abb. 8). Auch die Bestimmung der Aufnahme von Lactose in Gegenwart eines Überschusses an unmarkierter Galactose sollte darüber Aufschluß geben, ob die in Zellen des Stammes DP90CNal gemessene Aufnahme einer Aufnahme von Galactose entspricht oder nicht.

Entsprechendes gilt für den Stamm T184, der auf dem Episom die polare Z-Mutation Z^{U118} trägt, so daß aufgrund des polaren Effekts der Mutation die Expression des Y-Gens verhindert wird; der Stamm kann demnach keine funktionelle Lactose-Permease exprimieren.

Durch NEtMal läßt sich die in Zellen der Stämme DP90CNal und T184 gemessene Aufnahme hemmen. Dies könnte man so deuten, daß NEtMal durch kovalente Bindung vor allem an die äußere Membran sämtliche Poren verstopft, so daß kein Substrat in die Zellen gelangen kann.

Dieser Hemmeffekt wurde u. a. auch bei der Bestimmung der Aufnahme von Np∝Gal in mit NEtMal vorbehandelten Zellen des Stammes T217 gefunden; in Gegenwart von NEtMal findet keine Aufnahme von Np∝Gal statt (s. 3.2.7., Abb. 16). Dies widerspricht den in (36) geschilderten Ergebnissen, nach denen Np∝Gal passiv sehr schnell über die Cytoplasmamembran diffundiert. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ für den Efflux von Np∝Gal aus mit Np∝Gal beladenen Membranvesikeln des Wildtypstammes ML308-225 in Gegenwart von $ClHgBzSO_3$ wurde auf 40 s bestimmt ($ClHgBzSO_3$ entspricht in seiner Wirkungsweise der von NEtMal). Wenn der Efflux von Np∝Gal in Gegenwart von $ClHgBzSO_3$ so schnell erfolgt, dann sollte auch der Influx eine ähnliche Diffusionsgeschwindigkeit zeigen.

Eine mögliche Erklärung für die Dikrepanz zwischen den Ergebnissen der Zellversuche und den in (36) beschriebenen Versu-

chen mit Membranvesikeln zum Np∝Gal-Transport könnte in einer erhöhten passiven Permeabilität der Membranvesikel liegen.

Bestimmt man die Kinetik für den Efflux von Np∝Gal aus mit Stoppuffer (KP_i-Puffer incl. $HgCl_2$) behandelten Zellen des Stammes T217, so ist kein meßbarer Efflux zu beobachten; die passive Durchlässigkeit der Zellen ist demnach gering. Für den ungehemmten Efflux von Np∝Gal läßt sich für den Stamm T217 eine Halbwertszeit von 54 s bestimmen die damit in etwa dem $t_{1/2}$-Wert für den Efflux von Np∝Gal aus mit $ClHgBzSO_3$ vorbehandelten Vesikeln entspricht. Für den durch die Y^{59}-Lactose-Permease katalysierten Efflux von Np∝Gal läßt sich eine Halbwertszeit von ca. 100 s bestimmen; der Unterschied zum Wildtyp beträgt demnach nur einen Faktor 2. Durch Stoppuffer läßt sich wie im Wildtyp der Austrom von Np∝Gal hemmen; innerhalb der Meßzeit von 2 min ist noch über 90 % des Substrats in den Zellen vorhanden. Entsprechendes gilt für den Stamm T215, wobei der $t_{1/2}$-Wert für den ungehemmten Efflux von Np∝Gal mehr als doppelt so groß ist wie die für den Mutantenstamm T219 bestimmte Halbwertszeit. Die Kinetik entspricht in etwa der in Gegenwart von Stoppuffer gemessene Kinetik und stellt demnach die passive Diffusion von Np∝Gal aus den Zellen dar.

Für den Efflux von Lactose aus Zellen in Gegenwart von Stoppuffer gilt entsprechendes wie für den Np∝Gal-Efflux; innerhalb der Meßzeit von 2 min ist kein Ausstrom von Lactose aus Zellen der Stämme T206, T213 und T184 feststellbar. Für den nicht gehemmten Efflux von Lactose aus Zellen des Stammes T206 läßt sich eine Halbwertszeit ermitteln, die mit 5 s deutlich geringer ist als $t_{1/2}$ für das Substrat Np∝Gal. Für die Stämme T213 und T184 beträgt $t_{1/2}$ ca. 20 min und entspricht in etwa dem passiven Ausstrom von Lactose in Gegenwart von Stoppuffer.

Auch das Substrat GalSGal zeigt aus mit Stoppuffer inkubierten Zellen der Stämme T215, T217, T219 sowie T184, T206, T213 innerhalb von 2 min keinen meßbaren Efflux. Für den nicht gehemmten Ausstrom von GalSGal läßt sich sowohl für den Stamm

T217 als auch für den Stamm T206 eine Halbwertszeit von weniger als 30 s angeben. Somit fließt GalSGal noch schneller als NpαGal aus Zellen der Wildtypstämme heraus.

Vergleicht man die $t_{1/2}$-Werte für den GalSGal-Efflux aus Zellen der Y^-- und Y^{59}-Stämme miteinander, so wurden für die Z^--Stämme T184 und T213 jeweils kleinere Halbwertszeiten bestimmt als für die Z^+-Stämme T215 und T219. Die Werte für $t_{1/2}$ der einander entsprechenden Stämme (T215/T219 bzw. T184/T213) sind dabei untereinander in etwa gleich. Ursache für den langsameren Efflux von GalSGal aus Zellen der Z^+-Stämme könnte eine unspezifische Bindung von GalSGal an ß-Galactosidase sein.

Wechselbeziehung zwischen Struktur und Funktion des mutierten Lactose-Trägers.

Die kinetischen Eigenschaften der Y^{59}-Lactose-Permease sind letztendlich auf eine Änderung der DNA-Sequenz im Y-Gen zurückzuführen, woraus eine veränderte Konformation des Lactose-Trägers resultiert.

Durch die Rekombinationsversuche (s. 3.3.1. und 3.3.1.1.) wurde die für den Phänotyp der Y^{59}-Mutante (bzw. die für die Eigenschaften der Y^{59}-Lactose-Permease) verantwortliche Mutation im 5'-Ende des Y-Gens lokalisiert.

Die Bestimmung der DNA-Sequenz des für den NH_2-Terminus der Lactose-Permease kodierenden Genbereichs ergab drei Transitionen und zwar in Codon 7, 11 und 24.

Eine mögliche Erklärung für die dichte Häufung von Mutationen im 5'-Ende wäre der hohe AT-Gehalt dieser Genregion.

Die Stabilität von DNA ist eine direkte Funktion der GC-Nucleotidpaare, die über drei Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind. Je höher der molare Anteil an GC-Paaren in

der DNA ist, desto stabiler ist die DNA und desto höher liegt ihr Schmelzpunkt.

Das 5'-Ende des Y-Gens ist demnach wegen dem hohen AT-Gehalt instabiler als der übrige DNA-Bereich. Bei den während der Mutangenese vorliegenden Temperaturbedingungen (30 min bei 70°C) haben sich im 5'-Ende die DNA-Einzelstränge schneller getrennt als im übrigen DNA-Bereich, so daß NH_2OH bevorzugt im 5'-Ende des Y-Gens mutagen wirken konnte.

Die drei Basensubstitutionen führen zu den in Abb. 34 angegebenen Veränderungen in der Aminosäuresequenz.

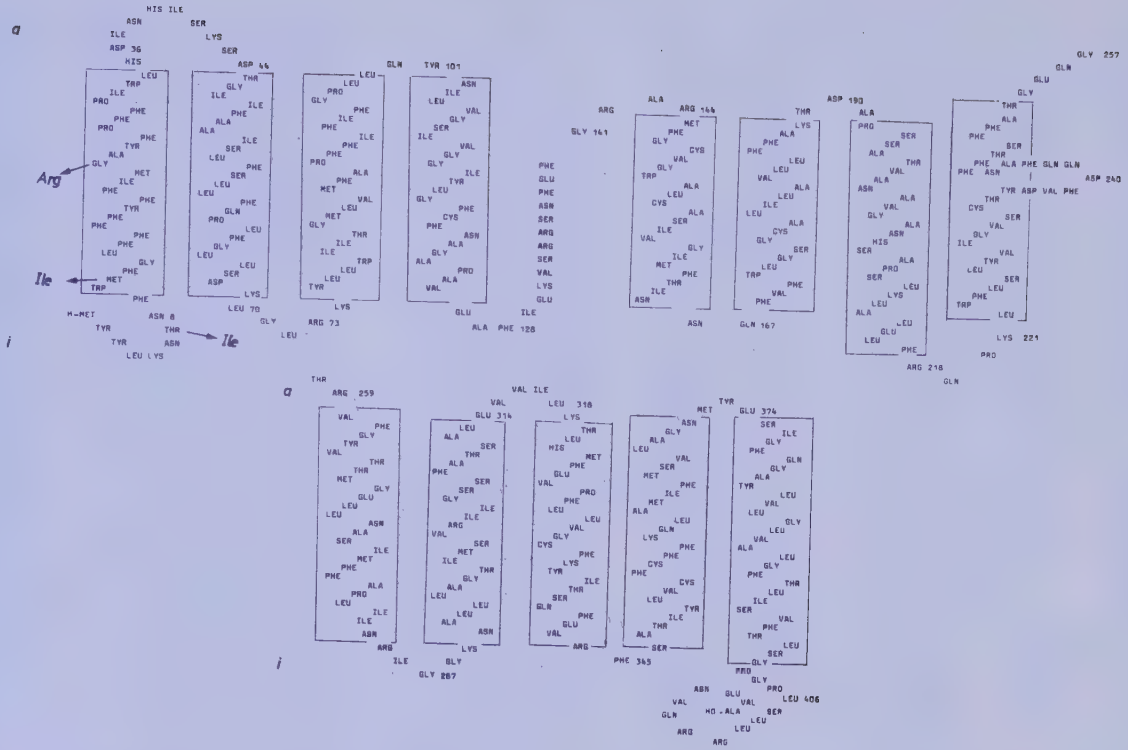


Abb. 34: Sekundärstruktur der Lactose-Permease; das Modell zeigt 13 mögliche membranumspannende α-Helices (nach Beyreuther, aus (37)). Die Austausche in Codon 7, 11 und 24 sind durch ⟶ gekennzeichnet.

Der Austausch in dem Codon 24 ($Gly^{24} \rightarrow Arg$) ist dabei, wie eine isolierte und sequenzierte Y^+-Reversion des Y^{59}-Gens gezeigt hat, für den Y^{59}-Phänotyp verantwortlich.

Durch die Aminosäure Arginin wird eine zusätzliche positive Ladung in das Protein eingeführt. Dadurch könnte sich die erste α-Helix zum Cytoplasma oder zum periplasmatischen Raum hin verschieben, wobei der in 3.5.2. beschriebene Effekt von Hg-UTP dahingehend gedeutet werden könnte, daß die erste α-Helix der Y^{59}-Lactose-Permease zur cytoplasmatischen Seite hin verschoben ist.

Wie in 3.5.2. beschrieben, läßt sich mit dem SH-Reagenz Hg-UTP die Bindung von NpαGal an ISO-Vesikel nicht aufheben, wohl aber durch andere Galactoside bzw. durch $ClHgBzSO_3$. Da in ISO-Vesikeln die Seite der Cytoplasmamembran, die in Zellen dem Cytoplasma zugewandt ist, jetzt nach außen gerichtet ist, wäre es denkbar, daß durch die positive Ladung des Arginins das ebenfalls positiv geladene Hg-UTP aufgrund elektrischer Abstoßung daran gehindert wird, das gebundene NpαGal von der Bindungsstelle (im Bereich um das Cystein 148), zu verdrängen, während in Zellen dieser Abschirmeffekt des Arginins gegen Hg-UTP nicht möglich ist, da das Arginin mehr der cytoplasmatischen Seite zugewandt ist.

Ebenfalls denkbar wäre, daß durch das positiv geladene Arginin die H^+-Bindung aufgrund elektrischer Abstoßung verhindert wird. Somit ließen sich die kinetischen Eigenschaften der Y^{59}-Lactose-Permease durch einen Defekt in der Protonenbindung erklären. Für diese Möglichkeit sprechen zum einen die in 3.5. beschriebenen Ergebnisse und zum anderen die in der Einleitung erwähnten Y^d1- und Y^{-K}-Mutanten, die ebenfalls im 5'-Ende des Y-Gens kartieren und einen Defekt in der Protonenbindungsstelle aufweisen sollen (27).

Bei den beiden anderen Substitutionen handelt es sich um stumme Mutationen bezüglich Bindung und Transport von Substrat, die

aber vielleicht für das Nichtbinden des Faktors III^{Glc} des PEP-Phosphotransferasesystems verantwortlich sein können, da die Y^{59}-Lactose-Permease den Faktor III^{Glc} nicht bindet (32). Wenn dies der Fall wäre, dann sollte die Y^{+}-Reversion der Y^{59}-Mutante ebenfalls den Faktor III^{Glc} nicht binden.

Wie die Charakterisierung von lacZY-Genfusionen gezeigt hat, können die ersten acht Aminosäuren des NH_2-Terminus der Lactose-Permease durch beliebige Aminosäuren ersetzt werden, ohne daß die Funktion einer solchen chimären Lactose-Permease wesentlich beeinträchtigt wird (3) (15). Demnach können die ersten acht Aminosäuren auch nicht in irgendeinerweise an dem Bindungs- und/oder Transportvorgang beteiligt sein. In dem in Abb. 34 gezeigten Modell ragen dabei die ersten acht Aminosäuren noch in den cytoplasmatischen Raum, während ab Aminosäure 9 die erste membranumspannende α-Helix anfangen soll.

Die von der Y^{59}-Mutante isolierte Reversion bestätigt die mit den Fusionsstämmen erhaltenen Ergebnisse, da in der Reversion die Basensubstitutionen in Codon 7 und 11 unverändert vorhanden sind. Man kann daher annehmen, daß im NH_2-Terminus der Lactose-Permease bis Aminosäure 11 Mutationen ohne Einfluß auf Struktur und Funktion der Lactose-Permease bleiben.

Der sich an Aminosäure 11 anschließende Bereich weist eine sehr hydrophobe Struktur auf, die wahrscheinlich für die Einlagerung der Lactose-Permease in die Cytoplasmamembran wichtig ist. Mutationen in diesem Bereich können zu einer veränderten Struktur und Funktion führen, wie die Y^{59}-Lactose-Permease zeigt. Der Einbau in die Membran wird dabei nicht beeinflußt.

Negative Dominanz im lacY-Gen

Eine charakteristische Eigenschaft makromolekularer Organisation ist eine aus mehreren Untereinheiten bestehende Struktur. Dies gilt für zahlreiche cytoplasmatische Proteine, wie z. B. die alkalische Phosphatase (Dimer, identische Untereinheiten) (49)

und die Glutamin-Synthetase (12 identische Untereinheiten) (56), als auch für membrangebundene Enzyme wie z. B. die F_1F_O-ATPase, ein aus mehreren nichtidentischen Untereinheiten bestehender Enzymkomplex (47).

Die in der äußeren Membran von E.coli vorhandenen Porine weisen ebenfalls eine oligomere Struktur auf, wie z. B. die Proteine OmpF, OmpC und das Rezeptorprotein für den Phagen Lambda, lamB, bei denen es sich um aus identischen Untereinheiten bestehende trimere Proteine handelt (8) (20) (46).

Durch die Aggregation von Untereinheiten wird es dem Protein ermöglicht, hydrophobe Regionen zu schützen sowie gegenüber proteolytischen Aktivitäten unempfindlicher zu werden. Ein weiterer Vorteil einer oligomeren Struktur ist, daß durch die Kombination von Proteinmonomeren zu einem Komplex eine Erhöhung der katalytischen Aktivität sowie eine erhöhte und/oder erweiterte Substratspezifität erreicht werden kann.

Für die Lactose-Permease von E.coli wurde ebenfalls eine oligomere (dimere) Struktur vorgeschlagen, wobei kinetische ($K_D \longrightarrow K_T$-Effekt) und genetische (Y^{-d}-Mutanten) Ergebnisse Grundlagen dieser Hypothese sind (s. Einleitung).

Die in (27) beschriebenen Y^{-d}-Mutanten sollen über das Y^+-Gen negativ-dominant sein.

Solche negativ-dominanten Mutanten wurden bisher nur für ein Membranprotein gefunden, und zwar für das lamB-Protein der äußeren Membran (25).

Wie die Charakterisierung der $Y^{-d}3$-Mutante gezeigt hat, konnte weder phänotypische noch kinetisch durch Bindungs- und Transportmessungen ein derartiger negativer Dominanzeffekt der $Y^{-d}3$-Mutation auf das Y^+-Gen festgestellt werden (s. 3.4.2.).

Die schlechte Expression der entsprechenden Gene in den getesteten Stämmen könnte dabei dafür verantwortlich sein, daß sich kinetisch dieser Dominanzeffekt nicht nachweisen ließ.

Für die Y^{59}-Mutation wurde ebenfalls versucht, einen negativen dominanten Effekt auf das Y^{+}-Gen nachzuweisen.

Aufgrund der mit den heterogenoten (Y^{+}/Y^{59})-Stämmen T25UW und T28UW durchgeführten Bindungs- und Transportmessungen zeigt die Y^{59}-Mutation keinen negativen Dominanzeffekt (s. 3.4.1.).

Zwar zeigen die beiden Stämme T25UW und T28UW eine erniedrigte Transportaktivität für die Substrate GalSGal und NpßGal im Vergleich zu ihren Kontrollen T24UW bzw. T44RT. Ursache für diese erniedrigte Transportrate des Stammes T25UW könnte aber eine nicht vollständige Induktion des Stammes sein.

Eine andere mögliche Erklärung wäre, daß der gemessene Unterschied in der GalSGal- und NpßGal-Aufnahme auf unterschiedliches Wachstum der homogenoten und heterogenoten Stämme zurückzuführen ist. Für diese Möglichkeit spricht die Tatsache, daß Stämme, die eines der Mutanten- bzw. Wildtypplasmide tragen, eine etwa doppelt so lange Generationszeit haben wie Stämme mit einer Y^{59}- bzw. Y^{+}-Genkopie auf einem F'-Faktor oder auf dem Chromosom.

Denkbar wäre auch, daß wegen der höheren Kopienzahl des Plasmids pGM 21/59 und der damit verbundenen höheren Konzentration an Y^{59}-Lactose-Permease-Molekülen bevorzugt Y^{59}-Lactose-Permease in die cytoplasmatische Membran eingebaut wird, dergestalt daß die Y^{59}-Lactose-Permease-Moleküle den Einbau von Y^{+}-Lactose-Permease in die Membran in irgendeinerweise hemmen.

Die in (48) vertretene Hypothese, daß in Gegenwart von $\Delta\tilde{\mu}_{H}^{+}$ der Lactose-Träger als Dimer in der Membran vorliegt, dagegen als Monomer, wenn $\Delta\tilde{\mu}_{H}^{+}=0$, wird durch die Versuche zur negativen Dominanz der $Y^{-d}3$- und Y^{59}-Mutation unwahrscheinlich, da die

Transportmessungen in Zellen, also in Gegenwart von $\Delta\tilde{\mu}_H^+$, durchgeführt wurden.

Ursprünglich wurde die $\Delta\tilde{\mu}_H^+$ -abhängige Monomer-Dimer-Hypothese zur Deutung des für Lactose als Substrat beobachtbaren $K_D \rightarrow K_T$-Effekts konzipiert. Wie die K_D- und K_T-Bestimmungen für andere Substrate gezeigt haben, tritt dieser $K_D \rightarrow K_T$-Effekt z. B. bei GalSGal, welches wie Lactose aktiv transportiert wird, nicht auf (65). Da die Lactose-Permease pro Polypeptidkette nur eine Bindungsstelle aufweist, kann man sich nur schwer vorstellen, daß eine durch $\Delta\tilde{\mu}_H^+$ bewirkte Dimersisierung nur eine Affinitätserhöhung der Lactose-Permease für Lactose bewirken soll, aber nicht für andere Substrate. Ebenso schwer vorstellbar ist, wie sich die Lactose-Permease-Monomere in der proteinhaltigen Cytoplasmamembran unter Einfluß von $\Delta\tilde{\mu}_H^+$ finden, erkennen und sich zu Dimeren assoziieren sollen.

Ein weiterer Punkt, der gegen eine $\Delta\tilde{\mu}_H^+$ -abhängige Dimerisierung der Lactose-Permease spricht, ist der für die Y^{59}-Lactose-Permease bestimmte K_D-Wert für das Substrat Lactose.

Die Bestimmung von $K_D^{Lactose}$ erfolgte in Abwesenheit von $\Delta\tilde{\mu}_H^+$ in cytoplasmatischen Membranvesikeln. Das K_D zeigt eine deutlich höhere Affinität der Y^{59}-Lactose-Permease zu dem Substrat Lactose als das $K_D^{Lactose}$ der Wildtyppermease (s. 3.2.1., Tab. 2). Diese Affinitätserhöhung beruht auf einer veränderten Konformation der Y^{59}-Lactose-Permease im Vergleich zur Wildtyppermease, wobei diese veränderte Konformation durch die Mutation im Codon 24 des Y^{59}-Gens bedingt ist. Eine veränderte Konformation kann demnach eine Affinitätsänderung nachsichziehen, so daß der $K_D \rightarrow K_T$-Effekt wahrscheinlich auf eine veränderte Konformation in Gegenwart von $\Delta\tilde{\mu}_H^+$ hindeutet. Der in (65) vorgeschlagene "Mobilitätseffekt" zur Deutung des $K_D \rightarrow K_T$-Effekts wird damit unwahrscheinlicher.

Schließlich wurde gezeigt, daß der funktionsfähige Lactose-Träger in Detergenz-Micellen als Monomer vorliegt (66). Eine dimere bzw. oligomere Struktur der Lactose-Permease von E.coli scheint somit unwahrscheinlich.

5. Zusammenfassung

Nach Mutagense des Plasmids pTE 18 (59) mit NH_2OH wurde von P. Overath eine Lac^--Mutante isoliert, die sich in einer ersten Charakterisierung durch die Fähigkeit, Substrat zu binden, aber nicht mehr zu transportieren, auszeichnete.

Die kinetische Analyse dieses neuartigen Typs von Mutante bzw. des mutierten Lactose-Trägers (Y^{59}-Lactose-Permease) ergab, daß der mutierte Lactose-Träger im Vergleich zur Wildtyppermease die Substrate Lactose und NpαGal mit deutlich höherer Affinität bindet, während das Substrat GalSGal mit einer dem Wildtyp ähnlichen Affinität gebunden wird.

Für die Substrate NpßGal, NpαGal und Lactose konnte aufgrund meßtechnischer Schwierigkeiten nur eine Transportaktivität der Y^{59}-Lactose-Permease von weniger als 0.4 % im Vergleich zur Wildtypaktivität ermittelt werden. Für das Substrat GalSGal konnte eine um einen Faktor 10 geringere Transportaktivität bestimmt werden, wobei das für GalSGal gemessene K_T in etwa dem $K_D^{GalSGal}$ des mutierten Lactose-Trägers entspricht. Somit läßt sich wie für den Wildtyp auch für die Y^{59}-Lactose-Permease kein $K_D \rightarrow K_T$-Effekt mit GalSGal als Substrat feststellen. Der Efflux von Substrat aus beladenen Zellen ist wie der Influx im Vergleich zum Wildtyp verlangsamt ($t_{1/2}^{Np\alpha Gal} > t_{1/2}^{Lactose} > t_{1/2}^{GalSGal}$).

Durch Rekombinationstests wurde das 5'-Ende des Gens als der die Mutation tragende Genbereich identifiziert. Die Bestimmung der für den NH_2-Terminus der Y^{59}-Lactose-Permease kodierenden Sequenz ergab drei Basensubstitutionen (Transitionen), die zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz führen ($Thr^7 \rightarrow Ile$; $Met^{11} \rightarrow Ile$; $Gly^{24} \rightarrow Arg$).

Die für die Eigenschaften der Y^{59}-Lactose-Permease verantwortliche Mutation ist der Austausch im Codon 24, wie die Charakterisierung einer Y^+-Reversion des Y^{59}-Gens gezeigt hat.

Durch das Arginin wird eine zusätzliche positive Ladung in das Protein eingeführt. Dadurch wird möglicherweise die Bindung von Protonen an den mutierten Lactose-Träger verhindert, was die kinetischen Eigenschaften der Y^{59}-Lactose-Permease erklären könnte.

Aufgrund der durchgeführten Bindungs- und Transportmessungen konnte weder für die Y^{59}-Mutation noch für die sog. negativ-dominante $Y^{-d}3$-Mutation (27) eine negative Dominanz über das Y^{+}-Gen beobachtet werden. Somit scheint eine dimere (oligomere) Struktur der Lactose-Permease unwahrscheinlich.

6. Literaturverzeichnis

1 Bachman, B. J., Low, K. B. (1980)
Microbiol. Rev. 44, 1 - 56

2 Beyreuther, K., Bieseler, B., Ehring, R., Müller-Hill, B. (1981) in Methods in Protein Sequence Analysis (ed. M. Elzinga), 139 - 148, Humana Press, Clifton, New Jersey

3 Bocklage, H., Müller-Hill, B. (1983)
Eur. J. Biochem. 137, 561 - 565

4 Bolivar, F., Rodriguez, R., Green, P. J., Betlach, M., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J., Falkow, S. (1977)
Gene 2, 95 - 113

5 Büchel, D., Groneborn, B., Müller-Hill, B. (1980)
Nature 283, 541 - 545

6 Cecchini, G., Koch, A. L. (1975)
J. Bacteriol., 123, 187 - 195

7 Chang, A. C. Y., Cohen, S. N. (1978)
J. Bacteriol. 134, 1141 - 1156

8 Clement, J. M., Hofnung, M. (1981)
Cell 27, 507 - 514

9 Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Hsu, L. (1972)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2110 - 2114

10 Colowick, S. P., Womack, F. C. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 774 - 777

11 Edlund, T., Grundström, T., Normark, S. (1978)
Molec. gen. Genet. 173, 115 - 125

12 Foster, D. L., Boublik, M., Kaback, H. R. (1982)
J. Biol. Chem. 258, 31 - 34

13 Foulds, J. (1972)
J. Bacteriol. 110, 1001 - 1009

14 Fox, C. F., Kennedy, E. P. (1965)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 54, 891 - 899

15 Griesser, H. W., Müller-Hill, B., Overath, P. (1983)
Eur. J. Biochem. 137, 567 - 572

16 Hengge, R., Boos, W. (1983)
Biochim. Biophys. Acta 737, 443 - 478

17 Hobson, A. C., Gho, D., Müller-Hill, B. (1977)
J. Bacteriol. 131, 830 - 838

18 Horowicz, D., Burke, J. F. (1981)
Nucleic Acids Res. 9, 2989 - 2998

19 Humphreys, G. O., Willshaw, G. A., Smith, H. R., Anderson, E. S. (1976)
Molec. gen. Genet. 145, 101 - 108

20 Inouye, M. (1979) in Bacterial outer membranes
(ed. M. Inouye)
John Wiley and Sons, New York

21 Kaback, H. R. (1971)
Methods in Enzymology 22, 99 - 120

22 Kaczorowski, G. J., Robertson, D. E., Kaback, H. R. (1979)
Biochemistry 18, 3697 - 3704

23 Klenow, H., Henningsen, I. (1970)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 65, 168 - 175

24 Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982)
Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, New York

25 Marchal, C., Hofnung, M. (1983)
The EMBO Journal 2, 81 - 86

26 Messing, J., Vieira, J. (1982)
Gene 19, 269 - 276

27 Mieschendahl, M., Büchel, D., Bocklage, H., Müller-Hill, B. (1981)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 7652 - 7656

28 Miller, J. H. (1972)
Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, New York

29 Miller, J. H. (1980)
The Operon, Cold Spring, Harbor, New York

30 Mitaku, S., Wright, J. K., Jähnig, F. (1983)
in Druck

31 Mitchell, P. (1961)
Nature 191, 144 - 148

32 Nelson, S., Wright, J. K., Postma, P. W. (1983)
The EMBO Journal 2, 715 - 720

33 Newman, M. J., Foster, D. L., Wilson, T. H., Kaback, H. R. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 11804 - 11808

34 Osborn, M. J., Gander, J. E., Parisi, E., Carson, J. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 3962 - 3972

35 Overath, P., Hill, F. F., Lamnek-Hirsch, J. (1971)
Nature New Biol. 234, 264 - 267

36 Overath, P., Simoni, R. M., Aichele, G., Wilhelm, U. (1977)
Biochemistry 18, 1 - 11

37 Overath, P., Wright, J. K. (1982)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 1409 - 1414

38 Overath, P., Wright, J. K. (1983)
TIBS, 11, 404 - 408

39 Padan, L., Patel, L., Kaback, H. R. (1979)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 6221 - 6225

40 Page, M. G. P., West, I. (1981)
Biochem. J. 196, 721 - 731

41 Page, M. G. P., West, I. (1982)
Biochem. J. 204, 681 - 688

42 Pardie, A. B., Jacob, F., Monod, J. (1959)
J. Mol. Biol. 1, 165 - 178

43 Patel, L., Garcia, M. L., Kaback, H. R. (1982)
Biochemistry 21, 5805 - 5810

44 Peterson, G. L. (1977)
Analyt. Biochem. 83, 346 - 356

45 Plate, C. A., Smit, J. L. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 12974 - 12980

46 Puspurs, A., Medon, P., Corless, C., Hackett, J., Reeves, P. (1983)
Molec. gen. Genet. 189, 162 - 165

47 Racker, E. (1976)
TIBS 1, 244 - 248

48 Robertson, D. E., Kaczorowski, G. J., Garcia, M. L., Kaback, H. R. (1980)
Biochemistry 19, 5692 - 5702

49 Rothman, F., Byrne, R. (1963)
J. Mol. Biol. 6, 330 - 340

50 Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463 - 5467

51 Sanger, F., Coulson, A. R., Barell, B. G., Smith, A. J. H., Roe, B. A. (1980)
J. Mol. Biol. 143, 161 - 178

52 Schnaitman, C. A. (1971)
J. Bacteriol. 108, 553 - 559

53 Schuldiner, S., Weil, R., Robertson, D. E., Kaback, H. R. (1977)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 1851 - 1854

54 Seckler, R., Wright, J. K., Overath, P. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 10817 - 10820

55 Singer, S. J., Nicolson, G. L. (1972)
Science 175, 720 - 731

56 Stadtman, E. R., Guisburg, A. (1974)
Enzymes 10, 755 - 807

57 Sutcliff, J. G. (1979)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 77 - 90

58 Teather, R. M., Müller-Hill, B., Abrutsch, U., Aichele, G., Overath, P. (1978)
Molec. gen. Genet. 159, 239 - 248

59 Teather, R. M., Bramhall, J., Riede, I., Wright, J. K., Fürst, M., Aichele, G., Wilhelm, U., Overath, P. (1980) Eur. J. Biochem. 108, 223 - 231

60 Uhlin, B. E., Nordstrom, K. (1978) Molec. gen. Genet. 165, 167 - 179

61 West, I. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 655 - 661

62 West, I. (1973) Ion Transport in Plants (ed. W. P. Anderson) 237 - 250 Academic Press, New York

63 West, I., Wilson, T. H. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 551 - 558

64 Wilson, T. H., Kusch, M., Kashket, E. R. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 1407 - 1414

65 Wright, I. K., Riede, I., Overath, P. (1981) Biochemistry 20, 6404 - 6415

66 Wright, J. K., Weigel, U., Lustig, A., Bocklage, H., Mieschendahl, M., Müller-Hill, B., Overath, P. (1983) FEBS Lett. 162, 11 - 15

67 Wright, J. K., Teather, R. M., Overath, P. (1983) Methods in Enzymology 97, 158 - 1765

68 Yamato, I., Rosenbusch, J. P. (1983) FEBS Lett. 151, 102 - 104

Die vorliegende Dissertation wurde von Mai 1981 bis März 1984 am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen in der Abteilung von Prof. Dr. P. Overath angefertigt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. P. Overath, daß er mir die Durchführung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat.

Für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft möchte ich mich besonders bei Dr. J. Keith Wright bedanken.

Ferner möchte ich mich bei Dr. Gabi Braun und Roland Freudl, MPI für Biologie, Abt. Henning, für ihre Unterstützung bei der DNA-Sequenzierung sowie bei Barbara Breitenbend für die Fotoarbeiten und bei meinem Vater für die Anfertigung der Zeichnungen bedanken.

Lebenslauf

Name:	Ulrich Weigel	
Geburtsdatum:	28. Januar 1956	
Geburtsort:	Duisburg	
Nationalität:	deutsch	
Familienstand:	verheiratet	
Ausbildung:	1962 - 1966	Grundschule Rheinhausen
	1966 - 1974	Gymnasium Rheinhausen
	1974	Abitur
	1974 - 1976	Diplom-Studiengang für Chemie an der Ruhr-Universität in Bochum
	1976	Vordiplom Chemie
	1976 - 1981	Diplom-Studiengang für Biologie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
	1978	Vordiplom Biologie
	1980	mündliche Diplomprüfung
	1980 - 1981	Diplomarbeit an der Universität Tübingen am Institut für Biologie I unter Anleitung von Prof. Dr. A. Hager
	1981 - 1984	Anfertigung der vorliegenden Arbeit am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. P. Overath